

**Entwicklung eines CMOS-integrierten  
massensensitiven Sensors  
zur Anwendung in der Biologie**

Von der Fakultät für Ingenieurwissenschaften  
Abteilung Elektrotechnik und Informationstechnik  
der Universität Duisburg-Essen

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Ingenieurwissenschaften

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Phys. Kim Burmester, geb. Martens

aus

Buchholz i.d.N.

1. Gutachter: Prof. Dr.-Ing. Holger Vogt

2. Gutachter: Dr. Teris A. van Beek

Tag der mündlichen Prüfung: 22. April 2015





# Zusammenfassung

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die Charakterisierung eines kapazitiven massensensitiven Drucksensors auf sein Resonanzverhalten und sein Auflösungsvermögen. Dafür wird ein Messsystem entwickelt, das den Sensor elektrostatisch zur Resonanz anregt und die Resonanzfrequenzen elektrisch misst. Das Resonanzverhalten wird mit unterschiedlichen Messmethoden verglichen. Das Auflösungsvermögen des Sensors wird mit Variation der elektrischen Spannungen optimiert und mit dünnen Goldschichten und Partikeln im Pikogrammbereich bestimmt.

Zusätzlich wird der Sensor biochemisch beschichtet und auf seine Selektivität untersucht. Dazu gehört der Nachweis der spezifischen Bindung mit Proteinen und Antikörpern auf dem Sensor.

Das Messsystem wurde durch Integration der Ausleseschaltung miniaturisiert und durch Integration der Fluidik automatisiert. Hierfür wurde die Ausleseschaltung auf den Sensorchip integriert und das Resonanzverhalten wurde mit dem des diskreten Sensors verglichen. Eine vollautomatische und programmierbare Fluidik wird entwickelt, die Flüssigkeiten auf den Sensor dispensiert, spült, trocknet und die Messung wieder aufnimmt. Der Sensor mit integrierter Elektronik wird in das Messsystem mit Fluidik integriert und im Spülprozess getestet. Zusätzlich wird eine Mikrofluidik mit Kapillarpumpe für den Sensor entwickelt, um das Probenvolumen zu reduzieren und das gesamte Messsystem zu miniaturisieren.



# Abstract

The present work shows the characterisation of a capacitive mass-sensitive pressure sensor on resonance behaviour and resolution. For this, a measurement system is developed, which electrostatically excites the sensor and electrically measures the resonance frequencies. The resonance behaviour is compared with different measurement methods. The resolution is optimized by varying the electrical voltages and is determined with thin gold layers and particles in the picogram range.

Additionally, the sensor is coated with a biochemical layer and is analyzed for its selectivity. This includes the detection of the specific binding of proteins and antibodies onto the sensor.

The measurement system is miniaturized by the integration of a readout circuit and is automatized by the integration of a fluidic system. The readout circuit is integrated on the sensor chip and the resonance behaviour is compared to the behaviour of the discrete sensor. A programmable fluidic is developed by dispensing liquids, rinsing, drying and measuring the frequency automatically. The sensor with integrated readout circuit is integrated into the fluidic system and tested by rinsing and drying. In addition, a microfluidic system with a capillary pump is developed to reduce the sample volume and to miniaturize the entire measurement system.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b>	<b>iii</b>
<b>Abstract</b>	<b>v</b>
<b>Abkürzungen und mathematische Symbole</b>	<b>ix</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2 Theoretische Grundlagen</b>	<b>5</b>
2.1 Massensensitiver Sensor . . . . .	6
2.1.1 Sensorherstellung . . . . .	6
2.1.2 Massensensitivität . . . . .	7
2.1.3 Bewegungsgleichung . . . . .	9
2.1.4 Dämpfung und Güte . . . . .	10
2.2 Modell der Oszillation . . . . .	12
2.2.1 Elektromechanisches Modell . . . . .	12
2.2.2 Nichtlinearität . . . . .	14
2.3 Biochemie des Sensors . . . . .	17
2.3.1 Biosensor . . . . .	17
2.3.2 Biomoleküle . . . . .	18
2.3.3 Biochemische Schicht . . . . .	20
2.3.4 Spezifische Bindung . . . . .	22
2.4 Stand der Technik . . . . .	25
2.4.1 Massensensitive MEMS-Sensoren . . . . .	25
2.4.2 CMOS-Integration . . . . .	27
<b>3 Experimente</b>	<b>29</b>
3.1 Übersicht . . . . .	29
3.1.1 Untersuchungsmethoden . . . . .	31
Kalibration des Sensors . . . . .	31

	Selektivität des Sensors . . . . .	32
3.1.2	Adaptersystem und Integrationen in das Messsystem . . . . .	33
3.2	Versuche zum Resonanzverhalten des Sensors . . . . .	36
3.2.1	Simulationen . . . . .	36
	Finite-Elemente-Modell . . . . .	36
	Lumped-Parameter-Modell . . . . .	37
3.2.2	Elektrostatisches Anregen und Auslesen des Sensors . . . . .	40
3.2.3	Laserinterferometrie . . . . .	41
3.3	Versuche zum Auflösungsvermögen des Sensors . . . . .	43
3.3.1	Präparation anorganischer Proben . . . . .	43
	Dünne Goldschichten . . . . .	43
	Nanopartikel und Mikrokugeln . . . . .	46
	Positionierung der Nanopartikel mit dem Nanodispenser . . . . .	48
3.3.2	Charakterisierung . . . . .	50
	Dünne Goldschichten . . . . .	50
	Nanopartikel und Mikrokugeln . . . . .	53
3.4	Versuche zur Selektivität des Sensors . . . . .	57
3.4.1	Präparation organischer Proben . . . . .	57
3.4.2	Charakterisierung . . . . .	58
3.5	Integration des Sensorprinzips . . . . .	60
3.5.1	CMOS-integrierte Ausleseschaltung . . . . .	60
3.5.2	Integration einer Mikrofluidik . . . . .	62
3.5.3	Integration einer programmierbaren Fluidik . . . . .	65
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>69</b>
4.1	Charakterisierung des Resonanzverhaltens . . . . .	70
4.1.1	Vergleich elektrischer zu optischer Messmethode . . . . .	70
4.1.2	Charakterisierung der Resonanzfrequenz . . . . .	74
	Stabilität der Resonanzfrequenz . . . . .	76
	Abhängigkeit von elektrischen Spannungen . . . . .	77
	Abhängigkeit vom Durchmesser der Sensormembran . . . . .	78
4.2	Auflösungsvermögen des Sensors . . . . .	82
4.2.1	Charakterisierung mit dünnen Goldschichten . . . . .	82
	Ermittlung der Massensensitivität durch Variation der Masse . . . . .	83
	Massensensitivität von Sensoren unterschiedlicher Durchmesser . . . . .	84
4.2.2	Charakterisierung mit Nanopartikeln und Mikrokugeln . . . . .	86

4.3	Selektivität des Sensors . . . . .	93
4.3.1	Charakterisierung mit Streptavidin auf Biotin . . . . .	94
	Biotin funktionalisierte Siliziumnitrid-Biosensoren . . . . .	94
	Biotin-PEG funktionalisierte Siliziumnitrid-Biosensoren . . . . .	98
	Biotin-PEG funktionalisierte Gold-Biosensoren . . . . .	100
4.3.2	Charakterisierung mit Biomarkern auf GM1 . . . . .	102
4.4	Integration des Sensorprinzips . . . . .	105
4.4.1	CMOS-integrierte Ausleseschaltung . . . . .	105
4.4.2	Integration einer programmierbaren Fluidik . . . . .	106
4.4.3	Integration einer Mikrofluidik . . . . .	107
<b>5</b>	<b>Diskussion und Ausblick</b>	<b>109</b>
<b>A</b>	<b>Eigene Veröffentlichungen</b>	<b>117</b>
A.1	In Zusammenhang mit dieser Dissertation . . . . .	117
A.2	Weitere Veröffentlichungen . . . . .	118
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>119</b>

# Abkürzungen und mathematische Symbole

## Abkürzungen

<b>AF488</b>	Alexa Fluor <sup>®</sup> 488
<b>AF647</b>	Alexa Fluor <sup>®</sup> 647
<b>Au</b>	Gold
<b>BAW</b>	bulk acoustic wave
<b>BSA</b>	Rinderserum, engl. bovine serum albumin
<b>BvD</b>	Butterworth van Dyke
<b>CDR</b>	circular diaphragm resonator
<b>CMOS</b>	komplementäre Metalloxid Halbleiter
<b>CMUT</b>	capacitive micromachined ultrasonic transducer
<b>ctxB</b>	Cholera Toxin B, engl. Cholera enterotoxin subunit B
<b>DAQ-Karte</b>	Datenerfassungskarte
<b>DI</b>	deionisiertem
<b>DIPEA</b>	Diisopropylethylamin
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>Fabs</b>	antigenbindenden Fragmenten
<b>Fc</b>	kristallierten Fragment
<b>FEM</b>	Finite-Elemente-Methode
<b>HF</b>	Flusssäure
<b>HP</b>	Hochpass

## Abkürzungsverzeichnis

<b>IC</b>	integrierte Schaltung
<b>IgG</b>	Immunoglobulin G
<b>LP</b>	Tiefpass
<b>LPM</b>	Lumped-Parameter-Modell
<b>MEMS</b>	Mikroelektromechanischen Systemen
<b>NIF</b>	non-interdigitated comb finger
<b>NMP</b>	1-methyl-2-pyrrolidone
<b>PBS</b>	Phosphat-gepufferte Salzlösung, engl. phosphate buffered saline
<b>PDMS</b>	Polydimethylsiloxan
<b>PEG</b>	Polyethylenglycol
<b>PFP</b>	Pentafluorophenyl Ester
<b>PCB</b>	Leiterplatte, engl. printed circuit board
<b>QCM</b>	Quarzkristall-Mikrowaage
<b>REM</b>	Rasterelektronenmikroskop
<b>ROIC</b>	integrierter Ausleseschaltung, engl. read out integrated circuit
<b>SPR</b>	Oberflächenplasmonenresonanz
<b>t-BuOK</b>	Kalium- <i>tert</i> -butoxid
<b>TFEE</b>	Trifluoroethanol Esther
<b>Triton X-100</b>	Polyethylene glycol tert-octylphenyl ether
<b>Tween20</b>	Tween <sup>®</sup> 20, Polyethylene glycol sorbitan monolaurate



## Mathematische Symbole

$A$	Sensorfläche [cm <sup>2</sup> ]
$B$	Halbwertsbreite
$c$	Analytenkonzentration [µg/ml]
$C$	Kapazität
$C_0$	Kapazität zwischen den Elektroden des Sensors
$C_k$	Kapazität der Kopplungskondensatoren [nF]
$D$	Biegesteifigkeit
$E$	Elastizitätsmodul [GPa]
$f(r)$	räumliche Auslenkung
$F_{\text{el}}$	elektrostatische Kraft
$F_{\text{mech}}$	mechanische Kraft der Massfeder
$f_s$	Resonanz des Schwingkreises im BvD Modell
$\Delta f$	Frequenzverschiebung [Hz]
$\Delta f_{\text{exp}}$	gemessene Frequenzverschiebung [Hz]
$\Delta f_{\text{th}}$	berechnete Frequenzverschiebung [Hz]
$f_0$	Resonanzfrequenz
$h$	Dicke der Goldschicht [µm]
$I(t)$	elektrischer Strom
$k_{\text{eff}}$	effektive Federkonstante
$k_{\text{Soft}}$	Federkonstante mit Spring Softening Effekt
$k_{\text{NL}}$	nichtlinearer Koeffizient
$L$	Induktion
$m_{\text{Au}}$	Masse der dünnen Goldschicht
$m_{\text{eff}}$	effektive Masse der Sensormembran
$m_{\text{Mikrokugel}}$	Masse einer Mikrokugel
$\Delta m$	Massenänderung, zusätzliche Masse auf dem Sensor [pg]
$\Delta m_{\text{min}}$	kleinste Massenänderung [pg]
$N$	Anzahl der Mikrokugeln auf einem Sensor
$Q$	Gütefaktor
$R$	Widerstand
$r_1$	unterer Trapezradius [µm]
$r_2$	oberer Trapezradius [µm]
$R_k$	Kopplungswiderstand [kΩ]
$R_m$	Sensorradius [µm]

$S$	Massensensitivität [Hz/pg]
$S_{\text{exp}}$	gemessene Massensensitivität [Hz/pg]
$S_{\text{th}}$	simulierte Massensensitivität [Hz/pg]
$S^{-1}/A$	Sensitivität auf gesamter Sensorfläche [pg/Hz/cm <sup>2</sup> ]
$sp$	Spacer, effektiver Abstand zwischen den Elektroden [nm]
$t_A$	Adhäsionszeit der Biomoleküle [min]
$t_m$	effektive Dicke der Sensormembran [μm]
$U(t)$	zeitabhängige sinusförmige Spannung
$U_{\text{AC}}$	sinusförmige Wechselspannung [V]
$U_{\text{DC}}, U_{\text{Bias}}$	Biasspannungen [V]
$U_{\text{DC-out}}$	Ausgangsspannung nach dem ROIC [V]
$\hat{U}_{\text{AC}}$	Amplitude der sinusförmigen Wechselspannung
$V_{\text{Au}}$	Volumen der Goldschicht
$V_{\text{Mikrokugel}}$	Volumen einer Mikrokugel
$V_{\text{Tropfen}}$	Tropfenvolumen [nl]
$Q(t)$	elektrische Ladung
$x$	Auslenkung der Sensormembran [μm]
$x_0$	maximale Amplitude der Auslenkung
$x_0(t)$	zeitabhängige Amplitude der Auslenkung
$\alpha, \beta$	numerische Konstanten
$\epsilon$	elektrische Feldkonstante
$\epsilon_0$	elektrische Feldkonstante im Vakuum
$\eta_{\text{elec}}$	elektrischer Transformationsfaktor
$\eta_{\text{mech}}$	mechanischer Transformationsfaktor
$\lambda$	effektive Dämpfung
$\Omega$	Frequenz der Wechselspannung [MHz]
$\Omega_0$	Eigenfrequenz des Sensors [MHz]
$\nu$	Poissonzahl
$\varphi$	Reflektionswinkel
$\rho$	spezifische Dichte der Sensormembran
$\rho_{\text{Au}}$	spezifische Dichte von Gold
$\zeta$	Dämpfungsfaktor

# 1 Einleitung

Etwa 20% der Erwachsenen in Europa glauben an Allergien zu leiden, die von mindestens einem der über 20.000 allergischen Proteinen ausgelöst werden [1] [2] [3]. Selbst wenn die Betroffenen wissen, welche allergischen Proteine die Reaktionen auslösen, benötigen sie ein kosteneffizientes handliches Gerät, mit dem sie ihre Lebensmittel selbstständig auf Allergene und Biomarker prüfen können.

Neben herkömmlichen Analysen wie der Massenspektroskopie oder der Oberflächenplasmonenresonanz (SPR) [4] [5] gibt es bereits sogenannte Labs on a chip. Hierbei sind die wichtigsten Komponenten zu Mikroelektromechanischen Systemen (MEMS) mit Mikrofluidik integriert. Bisher basieren solche Systeme auf der optischen Analyse der Lebensmittel [6] und erfordern daher eine externe Lichtquelle, die nicht auf den Sensorchip integriert werden kann. Die vorliegende Arbeit befasst sich mit möglichen Lösungen dieser Problematik.

Ein System für die Detektion von Allergenen und Biomarkern besteht aus drei Grundbausteinen: der Sensor, der die Signalveränderung misst und die Daten aufnimmt, die komplementäre Metalloxid Halbleiter (CMOS)-basierte integrierte Schaltung (IC), die das Signal verarbeitet, und die biochemische Schicht, an der die nachzuweisenden Proteine auf dem Sensor selektiv haften bleiben. Abbildung 1.1 stellt die Wechselbeziehung schematisch dar.

Der CMOS-Prozess ermöglicht eine kostengünstige und gemeinsame Herstellung des Sensors und der Schaltung. Die Vorteile der IC sind der Wegfall langer Kabelstränge und die Reduzierung von Signalverzögerungen, Fehleranfälligkeiten und Materialkosten.

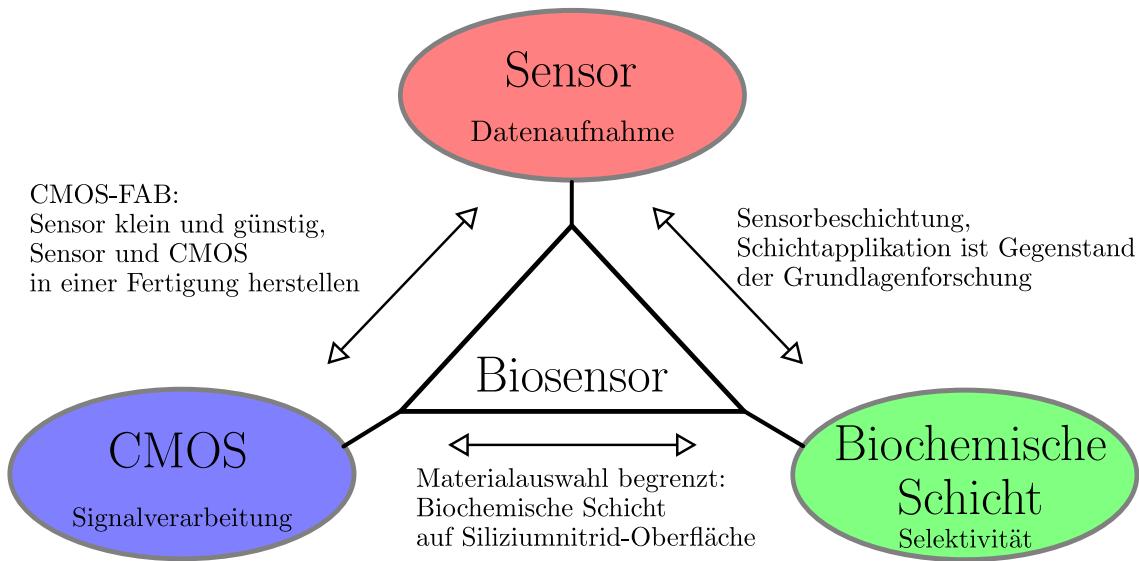


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung zur Wechselbeziehung zwischen MEMS-Sensor, CMOS-Integration und biochemischer Beschichtung des Sensors.

Jedoch schränkt die Herstellung im CMOS-Prozess die Auswahl des Sensormaterials ein, da Metalle wie Gold, Platin und Kupfer in die Schichten der integrierten Schaltung eindringen und so deren Funktion zerstören würden. Die erstmalige Entwicklung einer biochemischen Schicht auf Siliziumnitrid und der Nachweis der selektiven Bindung der Allergene an die Schicht war Aufgabe der Projektpartner.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung des in Abb. 1.1 dargestellten Systems. Die drei Elemente MEMS-Sensor, CMOS-IC und biochemische Schicht sollten in einem Biosensor vereint werden. Dazu war zunächst die Entwicklung eines automatischen Messsystems erforderlich, mit dem der Sensor charakterisiert wurde. Die folgenden Fragen standen dabei im Vordergrund:

- Wie sieht das Messsignal aus?
- Wie ist das Auflösungsvermögen des Sensors?
- Funktioniert die Selektivität der neuen biochemischen Schicht auf der Siliziumnitrid-Oberfläche des Sensors?
- Kann der biochemisch beschichtete Sensor die spezifische Bindung von Antikörpern nachweisen?

## *1 Einleitung*

Dafür wurde das Messsignal simuliert und experimentell untersucht. Die Stabilität und das Auflösungsvermögen wurden optimiert und die Massensensitivität des Sensors ermittelt. Zusätzlich wurde die Selektivität der biochemischen Schicht auf dem Sensor mit Proteinen auf spezifische Bindung untersucht und optimiert.

Am Ende wurde ein funktionsfähiger Sensor entwickelt und mit Antikörpern die biologische Anwendung qualitativ nachgewiesen.

In Kapitel 2 werden die theoretischen Grundlagen des massensensitiven Sensors und der Biochemie erläutert, um das Funktionsprinzip des Sensors zu verdeutlichen. Die Entwicklung des Messsystems und die Durchführung der Experimente werden in Kap. 3 beschrieben. Die Ergebnisse des Auflösungsvermögens und der Selektivität des massensensitiven Sensors werden in Kap. 4 vorgestellt und anschließend in Kap. 5 zusammengefasst und diskutiert.



## 2 Theoretische Grundlagen

In diesem Kapitel werden die theoretischen Grundlagen des massensensitiven Sensors erläutert, um das Funktionsprinzip zu verdeutlichen.

MEMS-Resonatoren, wie der Sensor in dieser Arbeit, werden u. a. als massensensitive Sensoren verwendet. Durch Variation der Masse wird eine elektromechanisch messbare Änderung der Resonanzfrequenz erzeugt. Sie werden im CMOS-Prozess hergestellt (vgl. Moran et al. in [7]). Die Herstellung und Eigenschaften von MEMS-Sensoren sind detailliert von Campanella [8] und das dynamische Verhalten von Younis [9] beschrieben.

Die Grundlage des vorliegenden Sensors ist ein kapazitiver Drucksensor, der elektrostatisch zur Oszillation angeregt wird. Die theoretischen Grundlagen des massensensitiven Sensors sind detailliert in der Patentanmeldung von Goehlich et al. beschrieben [10].

In Kapitel 2.1 werden die Eigenschaften des Sensors erläutert. Dazu gehören der Aufbau des Sensors, seine Massensensitivität und seine Bewegungsgleichung.

Das dynamische Verhalten wird in Kapitel 2.2 mit Hilfe des elektromechanischen Modells erläutert und in Kapitel 3.2 simuliert.

In Kapitel 2.3 wird die Biochemie dargestellt, die nötig ist um den Sensor biochemisch zu beschichten, sodass die Biomoleküle spezifisch am Massensensor haften bleiben.

Im Anschluss wird in Kapitel 2.4 eine Übersicht über den Stand der Technik gegeben. Dazu gehören massensensitive Sensoren, Biosensoren und deren CMOS-Integration.

## 2.1 Massensensitiver Sensor

### 2.1.1 Sensorherstellung

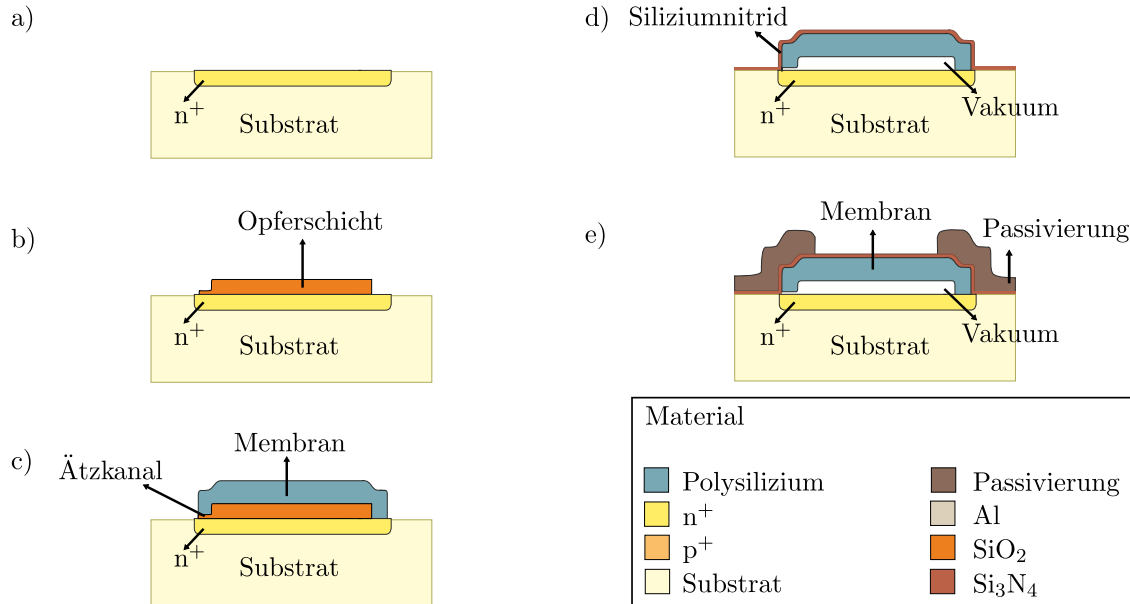


Abbildung 2.1: Herstellung des kapazitiven Drucksensors, nach [11].

In dieser Arbeit werden die Resonanzeigenschaften des kapazitiven Drucksensors untersucht. Detaillierte Beschreibungen über eine vergleichbare Herstellung und die Integration von Sensor und Elektronik am Fraunhofer IMS wurden von Dudaicevs et al. [11] und von Kasten et al. [12] vorgenommen.

Die Herstellung basiert auf einem Standard  $1,2\ \mu\text{m}$  CMOS-Prozess. In Abb. 2.1 nach [11] ist der Prozess zur Herstellung des Sensors schematisch dargestellt.

Eine  $n^+$ -Elektrode wird in das Substrat implantiert und bildet so eine Elektrode des Kondensators (Abb. 2.1a). Hierauf wird Siliziumdioxid ( $SiO_2$ ) als Opferschicht aufgebracht und definiert so die Dimensionen des Sensors (Abb. 2.1b).

Polykristallines Silizium wird aufgewachsen (Abb. 2.1c). Über einen Ätzkanal wird das Opferoxid lateral mit Flusssäure (HF) geätzt, sodass ein Hohlraum zwischen Membran und Implantationsgebiet entsteht. Im Anschluss wird eine dünne Schicht Siliziumnitrid auf den Sensor aufgetragen (Abb. 2.1d), wodurch der Ätzkanal verschlossen wird. Eine Passivierung wird zum Schutz der umgebenden Elektronik aufgetragen und über der Membran geätzt, damit diese frei liegt (Abb. 2.1e). Das Vakuum unterhalb der Membran reduziert die Dämpfung des MEMS-Sensors.



## 2 Theoretische Grundlagen

Der Sensor ist auf einem  $1,8 \times 3,2 \text{ mm}^2$  großen Sensorchip hergestellt. Auf dem Sensorchip sind verschiedene Layouts von diskreten Sensoren integriert. Die diskreten Sensoren unterscheiden sich durch den Membrandurchmesser, der zwischen  $50 \mu\text{m}$  und  $96 \mu\text{m}$  variiert. Sie sind sowohl einzeln, mit Referenzsensor als auch zu einem Array zusammengeschaltet und werden für die Charakterisierung des Resonanzverhaltens verwendet. Dies wird in Kapitel 3.3 erläutert.

Zusätzlich gibt es Sensoren mit Referenz und integrierter Ausleseschaltung, engl. read out integrated circuit (ROIC). Die CMOS-ROIC wird in demselben Prozess hergestellt wie die Sensoren und wird in Kapitel 3.5 beschrieben.

### 2.1.2 Massensensitivität

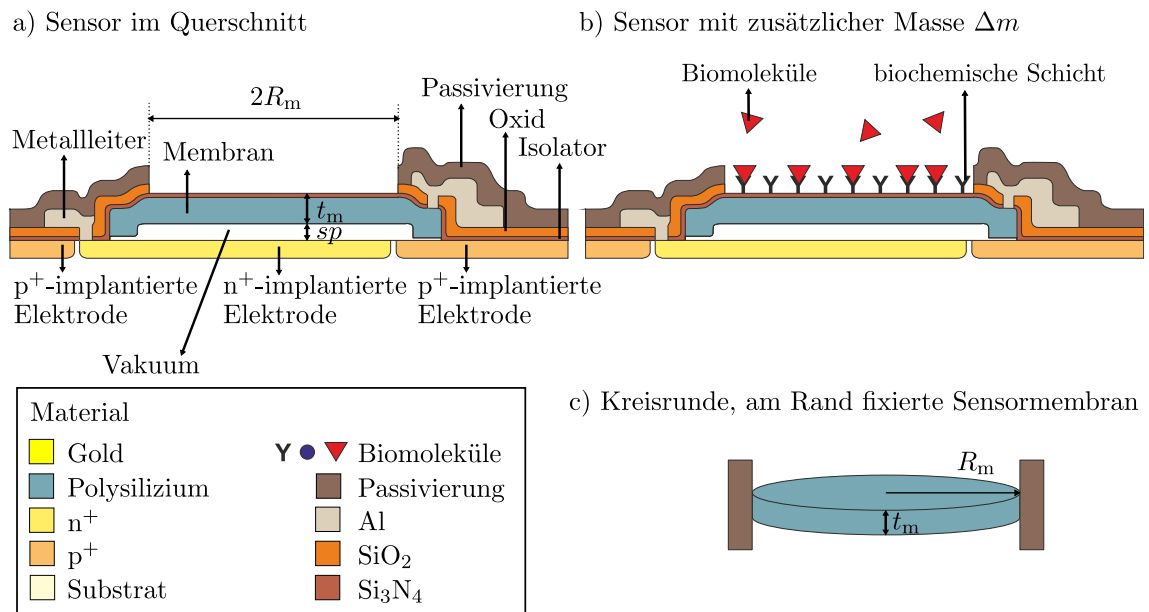


Abbildung 2.2: Modell des MEMS-Sensors, nach [13]. Schematische Darstellungen des kapazitiven Drucksensors (a) im Querschnitt und (b) mit zusätzlicher Masse  $\Delta m$ . (c) Modell einer kreisrunden, am Rand fixierten Sensormembran.

In dieser Arbeit wird u. a. das Auflösungsvermögen des kapazitiven Drucksensors anhand der Massensensitivität untersucht. Detaillierte Herleitungen der Resonanzfrequenzen und der Massensensitivitäten vergleichbarer MEMS-Sensoren wurden von Rhoads et al. [14] und Park et al. [15] durchgeführt.

Die Grundlage des Sensors ist ein kapazitiver Drucksensor, jedoch mit umgekehrtem

Funktionsprinzip. Hier wird die Sensormembran elektrostatisch zum Schwingen angeregt und die Auslenkung elektrisch ausgelesen. Der Querschnitt durch den Sensor ist in Abb. 2.2a schematisch dargestellt. Eine implantierte  $n^+$ -Elektrode und eine kreisrunde Sensormembran bilden die Elektroden des Plattenkondensators mit dem Abstand  $sp$ . Die Sensormembran hat eine Dicke  $t_m$  und einen Radius  $R_m$  und ist in grober Näherung am Rand fixiert (Abb. 2.2c).

In Abb. 2.2b setzen sich Biomoleküle auf der biochemisch beschichteten Sensoroberfläche ab. Sie wirken wie eine zusätzliche, variable Masse  $\Delta m$  und verschieben die Frequenz des Sensors um

$$\Delta f = -\frac{1}{2} \frac{\Delta m}{m_{\text{eff}}} \Omega_0 \quad (2.1)$$

mit  $m_{\text{eff}}$  und  $\Omega_0$  für effektive Masse und Eigenfrequenz der Sensormembran.

Die Oszillation der kreisrunden, am Rand fixierten Sensormembran (Abb. 2.2c) und deren Eigenfrequenz wird auf der Grundlage von der Poisson-Kirchhoff Theorie beschrieben [16]. Mit der Biegesteifigkeit  $D = Et_m^3 / (12(1 - \nu^2))$  ergibt sich für die natürliche Eigenfrequenz  $\Omega_0$  des Sensors

$$\Omega_0 = \frac{\alpha\beta}{2} \frac{t_m}{R_m^2} \sqrt{\frac{E}{12(1 - \nu^2)\rho}} = \frac{0,83}{R_m} \sqrt{\frac{Et_m^3}{m_{\text{eff}}(1 - \nu^2)}} \quad (2.2)$$

mit  $E$ ,  $\nu$ ,  $\rho$  für Elastizitätsmodul, Poissonzahl und spezifische Dichte der Sensormembran und mit den numerischen Konstanten  $\alpha$ ,  $\beta$  (vgl. [15], [17], [18]).

Die Massensensitivität ist definiert als

$$S = \frac{\Delta f}{\Delta m} \quad (2.3)$$

mit der Verschiebung  $\Delta f$  der Frequenz aufgrund einer zusätzlichen Masse  $\Delta m$ . Daraus folgt die Massensensitivität

$$S = -\frac{1}{2} \frac{\Omega_0}{m_{\text{eff}}} . \quad (2.4)$$

Anhand der Gl. 2.2 und 2.4 ist zu erkennen, dass die Sensitivität vom Sensorradius abhängig ist. Ein kleiner Sensor hat einen kleinen Radius  $R_m$  und eine geringe Masse  $m_{\text{eff}}$ , die die Eigenfrequenz  $\Omega_0$  und damit auch die Sensitivität erhöhen. Diese Abhängigkeit wird mit der Finite-Elemente-Methode (FEM) in Kap. 3.2 simuliert und dargestellt. Dafür wird, mit Berücksichtigung der speziellen Geometrie am Sensorrand, ein komplexeres Modell als das einer kreisrunden, am Rand fixierten Sensormembran (Abb. 2.2c) verwendet und die Eigenfrequenzen und die Massensensitivitäten werden für verschiedene Sensordurchmesser berechnet (vgl. Goehlich et al. in [19]).

### 2.1.3 Bewegungsgleichung

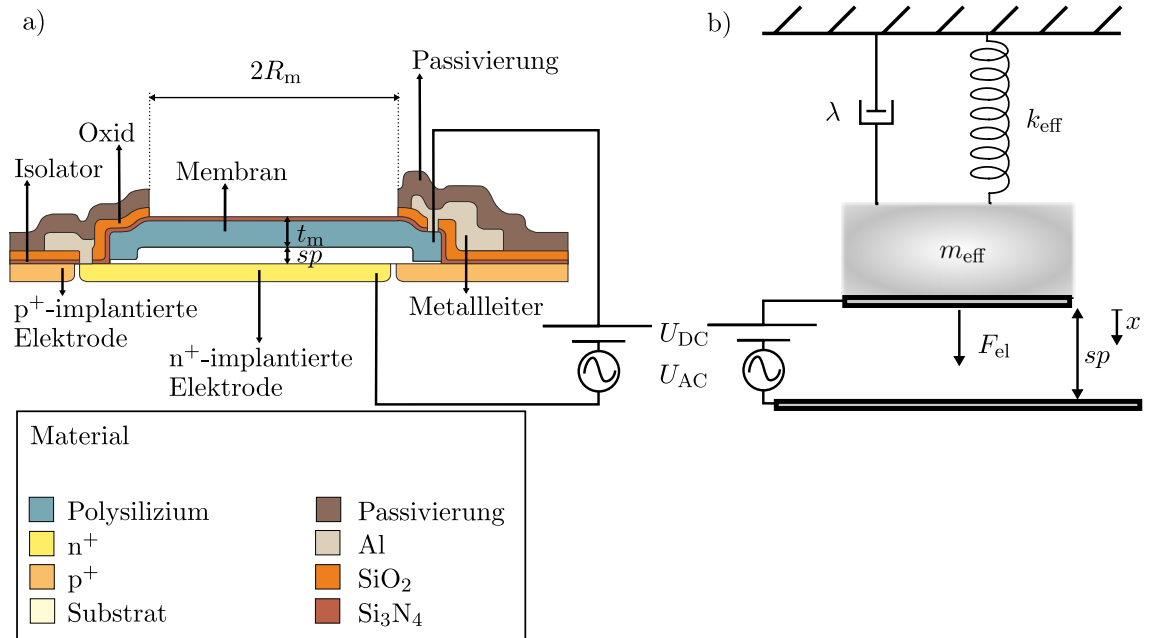


Abbildung 2.3: Modell des MEMS-Sensors. (a) Schematische Darstellung des kapazitiven Drucksensors im Querschnitt, nach [13]. (b) Mechanisches Modell, nach [9] (Kap. 3, S. 76).

Der Sensor (Abb. 2.3a) oszilliert nach dem mechanischen Modell einer Massefeder (Abb. 2.3b aus [9]) mit einer effektiven Federkonstante  $k_{eff}$  und einer Dämpfung  $\lambda$ . Die Sensormembran ist in Abb. 2.3b als effektive Masse  $m_{eff}$  dargestellt. Der effektive Abstand zwischen den beiden Elektroden ist  $sp$ .

An den Elektroden wird eine Spannung

$$U(t) = U_{DC} + \hat{U}_{AC} \sin(\Omega t) \quad (2.5)$$

angelegt. Die Biassspannung  $U_{DC}$  spannt die Sensormembran mechanisch vor.  $\hat{U}_{AC}$  und  $\Omega$  sind die Amplitude und Frequenz der sinusförmigen Wechselspannung  $U_{AC}$ . Die elektrostatische Kraft  $F_{el}$  zwischen den Elektroden regt den Sensor zum Schwingen an. Sie ist die elementare Kraft, um das dynamische Verhalten des Sensors zu beschreiben. Sie wird deshalb in den Simulationen mit dem Lumped-Parameter-Modell (LPM) benötigt. Dafür wird in Kapitel 2.2 ein elektromechanisches Modell für den kapazitiven Drucksensor erstellt.

Das dynamische Verhalten wird mechanisch über ein eindimensionales, Oszillator ähnliches Modell beschrieben [13]. Die Bewegungsgleichung lautet

$$m_{\text{eff}} \frac{d^2}{dt^2} x_0(t) + \lambda \frac{d}{dt} x_0(t) + k_{\text{eff}} x_0(t) + k_{\text{NL}} x_0^3(t) = F_{\text{el}}(t, x_0(t)) \quad (2.6)$$

mit den effektiven Parametern  $m_{\text{eff}}$ ,  $k_{\text{eff}}$  und  $\lambda$  für Masse, Federkonstante und Dämpfung. Die drei Parameter beeinflussen das Resonanzverhalten des Sensors. Der nicht-lineare Term mit dem Koeffizienten  $k_{\text{NL}}$  ist eine kleine Korrektur der theoretischen Mechanik (vgl. Landau in [20]).

Die Variation der effektiven Masse und ihr Einfluss auf die Eigenfrequenz wurden im vorigen Abschnitt anhand der Massensensitivität erläutert.

Die Federkonstante  $k_{\text{eff}}$  beschreibt mit der Auslenkung  $x_0(t)$  die lineare Rückstellkraft der Feder  $k_{\text{eff}} x_0(t)$ . Im sogenannten Spring-Softening Effekt [21] wird sie beeinflusst durch die elektrostatische Kraft, was wiederum die Eigenfrequenz verschiebt. Darauf wird in Kap. 2.2 näher eingegangen.

Die Dämpfung wird im folgenden Abschnitt anhand der Güte erklärt, die die Qualität von MEMS-Sensoren beschreibt.

#### 2.1.4 Dämpfung und Güte

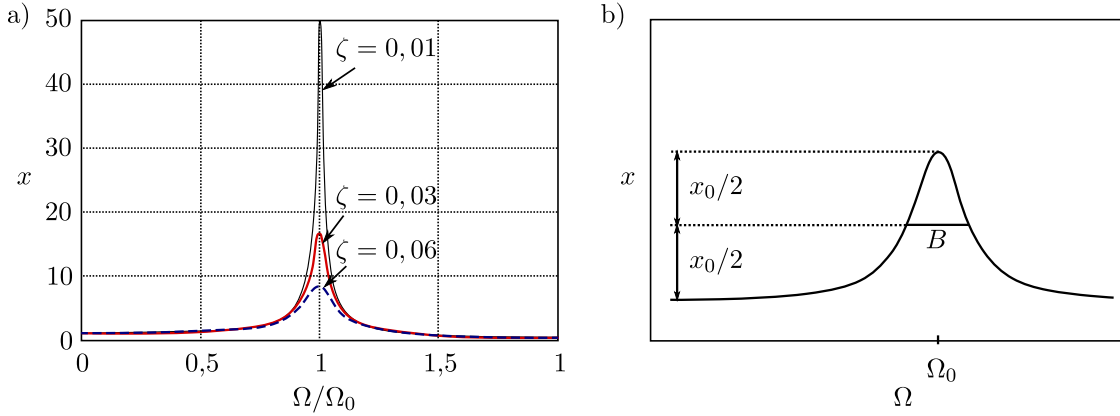


Abbildung 2.4: Resonanzkurven. (a) Einfluss der Dämpfung auf die Amplitude, nach [9] (Kap. 3, S. 76). (b) Schematische Darstellung zur Bestimmung des Gütefaktors.

Die Qualität von MEMS-Sensoren wird über den dimensionslosen Gütefaktor  $Q$  ausgedrückt, wobei Gütefaktoren im Bereich von  $10^3$  bis  $10^5$  erreicht werden [8]. Der Gütefaktor  $Q$  ist umgekehrt proportional zum Dämpfungsfaktor  $\zeta$ , also

$$Q = \frac{1}{2\zeta} . \quad (2.7)$$

## 2 Theoretische Grundlagen

Der Einfluss der Dämpfung auf die Qualität von MEMS-Sensoren ist z. B. von Younis detailliert beschrieben [9].

Abbildung 2.4 zeigt Resonanzkurven von MEMS-Sensoren. Wenn die Frequenz  $\Omega$  der äußeren Kraft die Eigenfrequenz  $\Omega_0$  des Sensors erreicht, ist die Amplitude maximal.

Der maximale Wert der Amplitude wird von der Dämpfung beeinflusst. Dies ist in dem Beispiel aus [9] in Abb. 2.4a zu sehen: Je größer der Dämpfungsfaktor  $\zeta = \lambda/2m_{\text{eff}} \Omega_0$ , desto größer der Energieverlust und desto kleiner die Amplitude. MEMS-Sensoren besitzen einen Dämpfungsfaktor  $\zeta$  kleiner als eins (vgl. [9]).

Aus der Resonanzkurve (Abb. 2.4b) wird der Gütefaktor ermittelt. Bei hohem Gütefaktor ist der Peak der Amplitude schmal und die Resonanzfrequenz hoch. Näherungsweise bedeutet dies

$$Q = \frac{\Omega_0}{B} \quad (2.8)$$

mit der Eigenfrequenz  $\Omega_0$  und der Halbwertsbreite  $B = 2\zeta\Omega_0$  [9].

Die Resonanzkurve des verwendeten Sensors wird in Kapitel 4.1 durch Laserinterferometrie gemessen und mit einer Lorentz-Kurve korreliert (Abb. 2.4b). Dabei wird eine kleine Wechselspannung zur elektrostatischen Anregung verwendet, um die Oszillation im linearen Bereich zu betreiben. Aus der Resonanzkurve wird mit Gl. 2.8 der Gütefaktor und mit Gl. 2.7 der Dämpfungsfaktor ermittelt.

### Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurden die theoretischen Grundlagen erläutert, die zur Charakterisierung des massensensitiven Sensors benötigt werden.

Anhand der Gl. 2.2 und 2.4 ist zu erkennen, dass die Sensitivität vom Sensorradius abhängig ist. Ein kleiner Sensor hat einen kleinen Radius  $R_m$  und eine geringe Masse  $m_{\text{eff}}$ , die die Eigenfrequenz  $\Omega_0$  und damit auch die Sensitivität erhöhen. Diese Abhängigkeit wird mit der FEM in Kap. 3.2 simuliert und dargestellt. Dafür wird, mit Berücksichtigung einer zusätzlichen Biegesteifigkeit am Sensorrand, ein komplexeres Modell als das einer kreisrunden, am Rand fixierten Sensormembran (Abb. 2.2c) verwendet und die Eigenfrequenzen und die Massensensitivitäten werden für verschiedene Sensordurchmesser berechnet.

Der Gütefaktor ist der Kehrwert des Dämpfungsfaktors. Beide werden aus der Resonanzkurve der harmonischen Oszillation ermittelt und mit MEMS-Sensoren aus der Literatur verglichen.

Der Aufbau des kapazitiven Drucksensors und sein mechanisches Modell einer Massfeder wurde anhand der Bewegungsgleichung erläutert. Die harmonische elektrostatische Kraft  $F_{el}$  regt den Sensor zum Schwingen an. Sie ist die elementare Kraft, um das dynamische Verhalten des Sensors im nächsten Kapitel zu beschreiben und im LPM zu simulieren. Dafür wird in Kapitel 2.2 das mechanische Modell des kapazitiven Drucksensors zu einem elektromechanischen Modell erweitert.

## 2.2 Modell der Oszillation

Das dynamische Verhalten des Sensors wird in Kapitel 3.2 simuliert. Es werden sowohl die Auslenkung als auch die Amplitude in Form des elektrischen Stroms untersucht. Dafür wird ein vereinfachtes Modell benötigt, das in die Simulation elektrischer Schaltungen integriert werden kann.

In diesem Kapitel werden die theoretischen Grundlagen kurz erläutert, die für die Simulation des dynamischen Verhaltens relevant sind. Das dynamische Verhalten wird über das elektromechanische Modell erklärt und mit der Nichtlinearität ergänzt.

### 2.2.1 Elektromechanisches Modell

Das mechanische Modell wird von der räumlichen Auflösung in einen endlichen Zustand reduziert. Wegen der Reduzierung auf endliche Parameter wird dies auch Lumped-Parameter-Modell (LPM) genannt [9].

Das Modell des kapazitiven Drucksensors ist in Abb. 2.5 dargestellt. Das mechanische Modell in Abb. 2.5a ist aus Kap. 2.1 bekannt. Der Sensor wird mechanisch über eine Biasspannung  $U_{DC}$  vorgespannt und elektrostatisch über die sinusförmige Wechselspannung  $U_{AC}$  mit der Frequenz  $\Omega$  zur Oszillation angeregt. Die elektrostatische Kraft  $F_{el}$  lenkt die Masse  $m_{eff}$  in  $x$ -Richtung aus. Mechanisch wird die Oszillation über die Bewegungsgleichung 2.6 beschrieben.

Die mechanischen Parameter des Oszillators können mit elektrischen Parametern ausgedrückt werden. Ein äquivalentes elektrisches Modell ist in Abb. 2.5b dargestellt. Das elektrische Modell wird auch Butterworth van Dyke (BvD) Modell genannt. Das Äquivalent zu den mechanischen Parametern  $m_{eff}$ ,  $\lambda$  und  $k_{eff}^{-1}$  ist jeweils der Widerstand  $R$ , die Induktion  $L$  und die Kapazität  $C$ . Sie beschreiben den mechanischen Teil. Links wird der elektrische Teil durch die elektrischen Spannungen  $U_{DC}$  und  $U_{AC}$  beschrieben. Zwischen den Elektroden, also der implantierten Elektrode und der Sensormembran, ist die Kapazität  $C_0$  parallel zur Spannungsquelle geschaltet.

## 2 Theoretische Grundlagen

In dem zum mechanischen Modell äquivalenten elektrischen Modell sind  $R, L$  und  $C$  in Reihe geschaltet. Die Resonanzfrequenz des Schwingkreises lautet

$$f_s = \frac{1}{2\pi\sqrt{LC}} . \quad (2.9)$$

Das BvD Modell gilt näherungsweise. Ein genaueres LPM hat Bannon et al. in [22] erstellt. Dem BvD Modell werden elektromechanische Transformationen hinzugefügt. Dies ist im elektromechanischen Modell in Abb. 2.5c aus [22] schematisch dargestellt. Der mechanische Teil in der Mitte wird durch die äquivalenten Parameter  $m_{\text{eff}}$ ,  $\lambda$  und  $k_{\text{eff}}$  beschrieben. Links ist der elektrische Teil mit den elektrischen Spannungen  $U_{\text{DC}}$  und  $U_{\text{AC}}$ . Die Kapazität  $C_0$  ist weiterhin parallel zur Spannungsquelle. Die elektromechanische Transformation wird durch den Faktor  $\eta_{\text{elec}}$  dargestellt. Rechts ist der mechanische Teil mit der mechanischen Kraft  $F_{\text{mech}}$  der Massfeder. Die mechanische Kopplung mit dem Resonator wird durch den Faktor  $\eta_{\text{mech}}$  ausge-

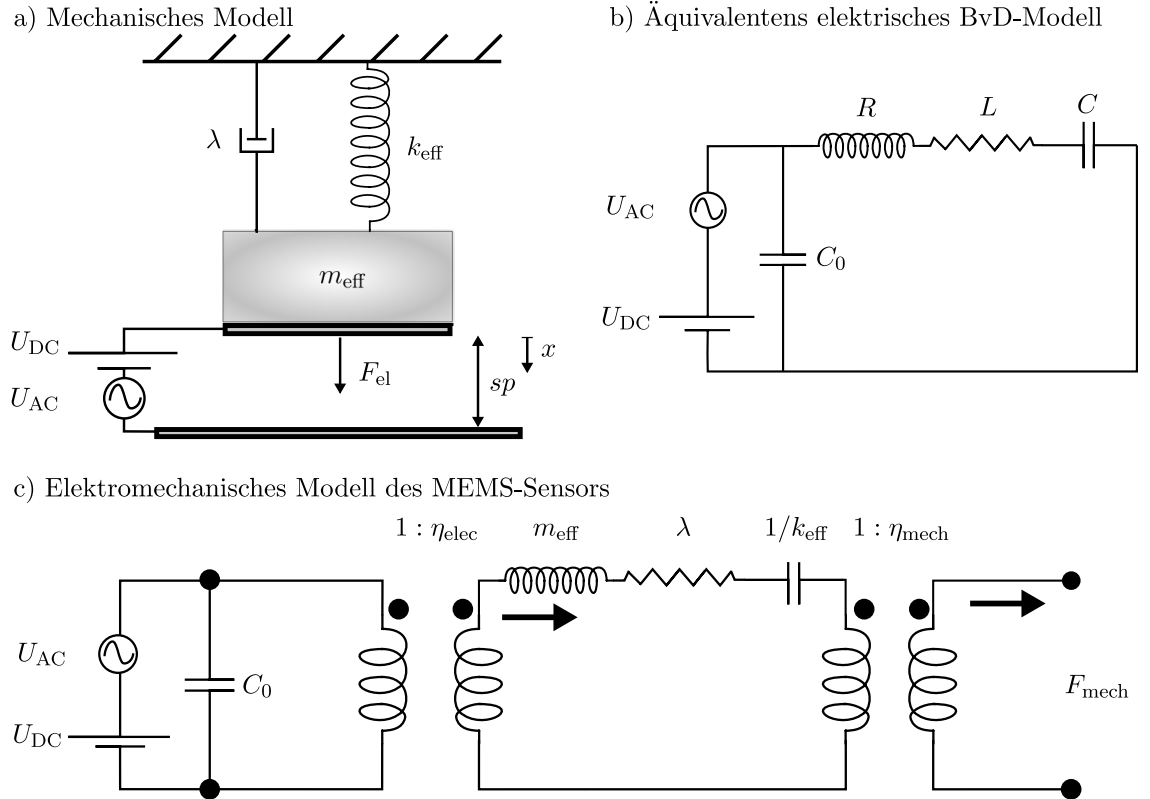


Abbildung 2.5: Modell des MEMS-Sensors. (a) Mechanisches Modell, nach [9] (Kap. 3, S. 76). (b) Äquivalenter Butterworth van Dyke Schaltkreis. (c) Elektromechanisches Modell, nach [22].

drückt.

Das elektromechanische Modell beschreibt die Transformation von der elektrischen Spannung zur mechanischen Kraft. Die elektrische Spannung  $U(t)$  aus Gl. 2.5 induziert eine elektrostatische Kraft [13]

$$F_{\text{el}}(x_0(t)) = \frac{1}{2} \epsilon \epsilon_0 U^2(t) \int_0^{R_m} \frac{2\pi r \, dr}{[sp - x(r, t)]^2} \quad (2.10)$$

zwischen den Elektroden und regt den Sensor zum Schwingen an. Das bewirkt eine mechanische Oszillation mit einer mechanischen Kraft. Die mechanische Kraft wiederum bewirkt eine Auslenkung  $x(r, t) = x_0(t)f(r)$ , die eine zeitabhängige Amplitude  $x_0(t)$  und eine zeitunabhängige, achsensymmetrische und räumliche Auslenkung  $f(r)$  enthält. Die Änderung der Distanz zwischen den Elektroden bewirkt eine Änderung in der Kapazität

$$C_0(t) = \epsilon \epsilon_0 \int_0^{R_m} \frac{2\pi r \, dr}{sp - x(r, t)} \quad (2.11)$$

und daraus folgt der elektrische Strom

$$I(t) = \frac{d}{dt} Q(t) = \frac{d}{dt} [C(t)U(t)] = \frac{d}{dt} \left[ U(t) \epsilon \epsilon_0 \int_0^{R_m} \frac{2\pi r \, dr}{sp - x(r, t)} \right]. \quad (2.12)$$

Mit Hilfe des elektromechanischen Modells und der Bewegungsgleichung kann das dynamische Verhalten der harmonischen Resonanzkurve simuliert werden, um die elektrischen Spannungen abzuschätzen. Die Bewegungsgleichung 2.6 wird mittels Runge-Kutta Verfahren [23] numerisch gelöst. Dafür wird die Bewegungsgleichung zeitlich integriert. Die Integrale der elektrostatischen Kraft in Gl. 2.10 und des elektrischen Stroms in Gl. 2.12 werden analytisch berechnet und in Kap. 3.2 in Form der Auslenkung und der Amplitude des elektrischen Stroms dargestellt.

### 2.2.2 Nichtlinearität

Ladabaum et al. hat für einen vergleichbaren Sensor mit kreisrunder Membran experimentell nachgewiesen, dass bei steigender Biasspannung die Amplitude in der anharmonischen Resonanzkurve kollabiert und die Frequenz verschoben wird [21]. Die elektrostatische Kraft  $F_{\text{el}}$  zwischen den Elektroden regt den Sensor zum Schwingen an und wird durch die elektrische Spannung  $U(t) = U_{\text{DC}} + \hat{U}_{\text{AC}} \sin(\Omega t)$  erzeugt. Mit  $\hat{U}_{\text{AC}} \ll U_{\text{DC}}$  [24] gilt näherungsweise

$$U^2(t) = [U_{\text{DC}} + \hat{U}_{\text{AC}} \sin(\Omega t)]^2 \approx U_{\text{DC}}^2 + 2U_{\text{DC}} \hat{U}_{\text{AC}} \sin(\Omega t) \quad (2.13)$$



## 2 Theoretische Grundlagen

und dadurch ist die elektrostatische Kraft  $F_{\text{el}}$  in Gl. 2.10 proportional zum Quadrat der Biasspannung, was sich sowohl auf die Amplitude als auch auf die Frequenz auswirkt.

Der Sprung in der Resonanzkurve entsteht durch den nichtlinearen Term der Auslenkung  $x(r, t) = x_0(t)f(r)$  in der elektrostatischen Kraft (Gl. 2.10). Wird der Term entwickelt, entsteht eine Nichtlinearität in der Bewegungsgleichung, die, ähnlich wie in der theoretischen Mechanik (vgl. Landau et al. in [20]), einen Sprung in der Auslenkung erzeugt. Die zeitabhängige Auslenkung  $x_0(t)$  und daraus der Strom  $I(t)$  werden in Kap. 3.2 analytisch berechnet und dargestellt.

Aufgrund des Sprungs in der Auslenkung ist der Sprung auch in der Amplitude des elektrischen Stroms zu erkennen. Die Position des Amplitudensprungs ergibt die Resonanzfrequenz, die zur experimentellen Bestimmung der Massensensitivität wichtig ist. Sie wird mit steigender Biasspannung durch den Spring-Softening Effekt verschoben.

Die Federkonstante  $k_{\text{eff}}$  beschreibt mit der Auslenkung  $x_0(t)$  die lineare Rückstellkraft der Feder  $k_{\text{eff}}x_0(t)$ . Der Spring-Softening Effekt [21] ändert die Federkonstante  $k_{\text{eff}}$  zu

$$k_{\text{Soft}} = k_{\text{eff}} - \frac{\epsilon 2\pi R_{\text{m}}}{sp^3} U_{\text{DC}}^2 \quad (2.14)$$

und damit auch die Eigenfrequenz  $\Omega_0$  des Sensors zu

$$f_0 = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k_{\text{eff}}}{m_{\text{eff}}} - \frac{\epsilon 2\pi R_{\text{m}}}{m_{\text{eff}} sp^3} U_{\text{DC}}^2} . \quad (2.15)$$

Das heißt, dass die Auslenkung im Masse-Feder-System proportional zum Quadrat der Biasspannung ist. Wird die Biasspannung  $U_{\text{DC}}$  erhöht, steigt die elektrostatische Kraft  $F_{\text{el}}$ . Die Rückstellkraft der Feder  $k_{\text{eff}}x_0(t)$  aus der Bewegungsgleichung 2.6 wirkt dem mechanisch entgegen und dadurch ändert sich die Federkonstante zu  $k_{\text{Soft}}$ . Das reduziert die Eigenfrequenz  $\Omega_0$  des Sensors.

Der Einfluss des Spring-Softening Effekts auf die Eigenfrequenz des Sensors wird mit LPM in Kap. 3.2 simuliert. Dafür wird die elektrostatische Kraft  $F_{\text{el}}$  zu unterschiedlichen Biasspannungen berechnet und in Form des elektrischen Stroms dargestellt.

### Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurden die theoretischen Grundlagen erläutert, die zur Simulation des dynamischen Verhaltens benötigt werden. Mit Hilfe des eindimensionalen elektromechanischen Modells kann das dynamische Verhalten der Resonanzkurve simuliert werden, um die elektrischen Spannungen abzuschätzen und mit den in Kap. 3.2

beschriebenen Messungen zumindest qualitativ zu vergleichen. Die Bewegungsgleichung 2.6 wird mittels Runge-Kutta Verfahren [23] numerisch gelöst. Dafür wurden die Integrale der elektrostatischen Kraft in Gl. 2.10 und des elektrischen Stroms in Gl. 2.12 analytisch berechnet [13]. In Kap. 3.2 werden die Simulationsergebnisse in Form der Auslenkung und der Amplitude des elektrischen Stroms dargestellt. Dabei werden die Parameter des mechanischen Modells aus Kap. 2.1 im LPM mit elektrischen Parametern ausgedrückt.

Die Nichtlinearität wird durch den nichtlinearen Term in der elektrostatischen Kraft  $F_{\text{el}}$  (Gl. 2.10) ausgedrückt. Der Sprung in der Resonanzkurve entsteht durch den nichtlinearen Term der Auslenkung  $x(r, t) = x_0(t)f(r)$  in der elektrostatischen Kraft (Gl. 2.10). Wird der Term entwickelt, entsteht eine Nichtlinearität in der Bewegungsgleichung, die einen Sprung in der Auslenkung erzeugt. Die zeitabhängige Auslenkung  $x_0(t)$  und daraus der Strom  $I(t)$  werden in Kap. 3.2 analytisch berechnet und dargestellt.

Aufgrund des Sprungs in der Auslenkung ist der Sprung auch in der Amplitude des elektrischen Stroms zu erkennen. Die Position des Amplitudensprungs ergibt die Resonanzfrequenz, die zur experimentellen Bestimmung der Massensensitivität wichtig ist.

Näherungsweise ist die elektrostatische Kraft proportional zum Quadrat der Biasspannung  $U_{\text{DC}}$ . Wird die Biasspannung erhöht, steigt die elektrostatische Kraft und die Rückstellkraft der Feder wirkt dem mechanisch entgegen. Dieser elektrostatische Spring-Softening Effekt verschiebt die Resonanzfrequenz aufgrund der veränderten Federkonstante. Der Einfluss des Spring-Softening Effekts auf die Eigenfrequenz des Sensors wird mit LPM in Kap. 3.2 simuliert. Dafür wird die elektrostatische Kraft  $F_{\text{el}}$  zu unterschiedlichen Biasspannungen berechnet und in Form des elektrischen Stroms dargestellt.

## 2.3 Biochemie des Sensors

In diesem Kapitel werden die theoretischen Grundlagen des Biosensors erklärt. Die Funktionsprinzipien der Biosensoren, der Affinität der Biomoleküle und deren Wechselwirkungen sind von Pethig und Smith im Detail beschrieben [25]. Die Biochemie ist von Lahann et al. detailliert beschrieben [26].

### 2.3.1 Biosensor

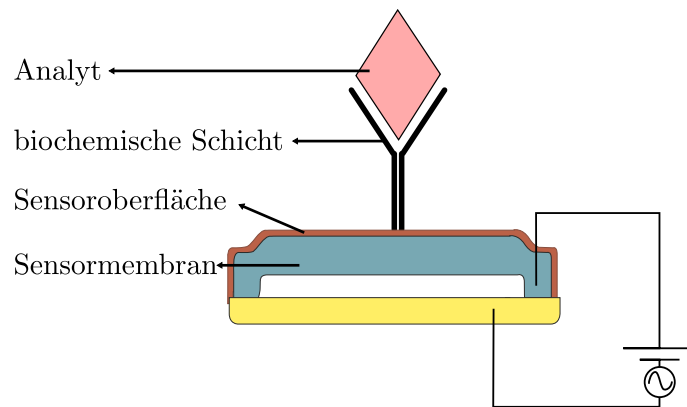


Abbildung 2.6: Aufbau des Biosensors.

Der Biosensor in dieser Arbeit beruht auf der Bindungsaffinität zwischen Rezeptor und Analyt, wie es in Abb. 2.6 dargestellt ist. Analyte sind die Biomoleküle, die selektiv auf dem Biosensor nachgewiesen werden sollen. Dazu gehören beispielsweise Proteine und Zellen.

Proteine sind lange Polypeptidketten aus Aminosäuren, die sich zu dreidimensionalen Strukturen formen, z. B. Antikörper und Enzyme. Dabei wirken nichtkovalente Wechselwirkungen, wie z. B. van der Waals Kräfte oder Ionenaustausch.

Um die Analyten in einem komplexen Medium wie z. B. Blut, Saft oder Speichel nachzuweisen, wird die Oberfläche des Biosensors mit Rezeptoren beschichtet. Die Biomoleküle werden kovalent auf der Biosensoroberfläche immobilisiert, sodass eine Monolage aus Rezeptoren entsteht, welche die biochemische Schicht bilden.

Die Analyte werden physikalisch adsorbiert, d. h. sie werden von nichtkovalenten Wechselwirkungen an die Rezeptoren des Sensors gekoppelt.

Die verwendeten Biomoleküle werden in Kapitel 2.3.2 kurz erläutert. Dazu gehören die Rezeptoren und die Analyte. Die Funktionalisierung der Rezeptoren auf

die Sensoroberfläche wird in Kapitel 2.3.3 beschrieben. Die spezifische Bindung von Analyt und Rezeptor wird in Kapitel 2.3.4 kurz erläutert.

### 2.3.2 Biomoleküle

Eine Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Biomoleküle ist in Abb. 2.7 und 2.8 gegeben. Sie sind Proteine und sie sind nach ihrer hier verwendeten experimentellen Anwendung und Bindung kategorisiert in Streptavidin (Abb. 2.7) und Biomarker (Abb. 2.8).

#### Streptavidin

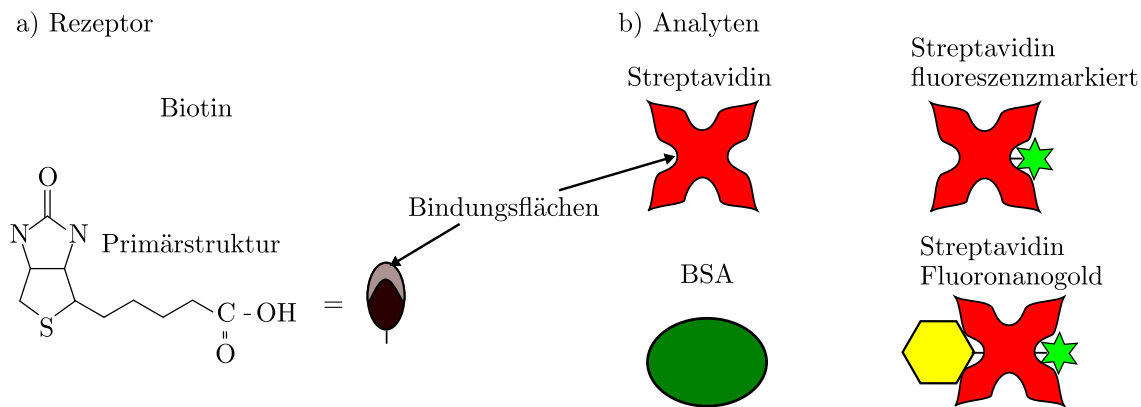


Abbildung 2.7: Biomoleküle für den Nachweis mit Streptavidin. Primärstruktur des Moleküls Biotin nach [27].

In dieser Arbeit werden Biotin als Rezeptor (Abb. 2.7a) und Streptavidin als Analyt (Abb. 2.7b) verwendet. Streptavidin bindet nichtkovalent an Biotin, zeigt aber eines der stärksten aus der Natur bekannten Bindungen [28]. Wegen ihrer starken spezifischen Bindung werden sie für Biosensoren verwendet (vgl. [29], [30], [31]).

Das Molekül Biotin wird auch Vitamin H genannt. Es kommt in Lebensmitteln wie z. B. Eigelb vor. Die Primärstruktur von Biotin ist aus [27] in Abb. 2.7a dargestellt. Streptavidin hat eine Masse von 60 kDa und es hat vier Bindungsflächen, an denen sich Biotin binden kann [32].

Das Protein Rinderserum, engl. bovine serum albumin (BSA) besitzt mit 65 kDa [33] eine ähnliche Masse wie Streptavidin, bindet aber nicht an Biotin und wird deshalb als negative Probe für den Nachweis der spezifischen Bindung verwendet.

## 2 Theoretische Grundlagen

Zusätzlich können Proteine mit Nanopartikeln [34] und Fluoreszenzmarkierungen konjugiert werden. Die Konjugation von Proteinen ist von Schilling et al. im Detail beschrieben [26].

In Abb. 2.7b sind die funktionalisierten Proteine mit Goldnanopartikel und Fluoreszenzmarkierung schematisch dargestellt. Die fluoreszenzmarkierten Proteine werden für den Nachweis der spezifischen Bindung und für die lokalisierte Immobilisation verwendet, welche über Fluoreszenzspektroskopie gemessen wird [35].

### Biomarker

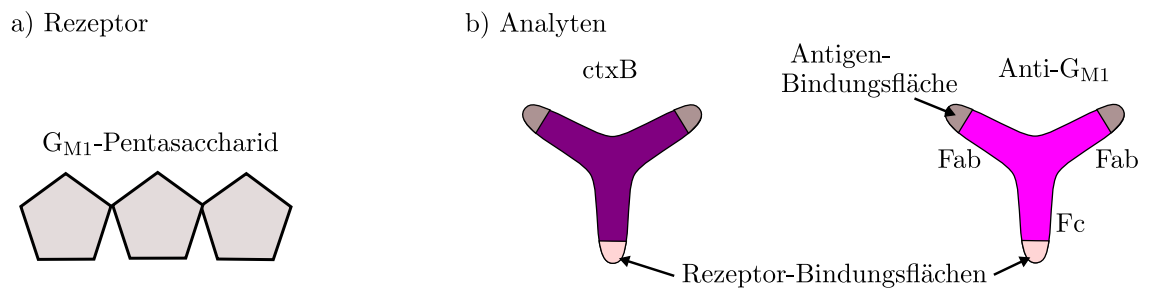


Abbildung 2.8: Biomoleküle für den Nachweis mit ctxB und Anti- $G_{M1}$ .

In dieser Arbeit wird der Zuckeranteil des Gangliosids  $G_{M1}$  als Rezeptor verwendet (Abb. 2.8a), an dem die Analyten Cholera Toxin B, engl. Cholera enterotoxin subunit B (ctxB) und Anti- $G_{M1}$  binden (Abb. 2.8b).

Das Cholera Toxin Protein besteht aus zwei Komponenten [28]: ctxA und ctxB. Die Komponente A bildet den giftigen Anteil. Die Komponente B wird ctxB genannt und bildet eine Pentamer-Basis mit einer Masse von 57 kDa [36]. Das ctxB ist nicht giftig und wird daher als Analyt für den Biosensor verwendet. An die Pentamer-Basis des ctxB binden sich Zuckermoleküle des Gangliosids  $G_{M1}$  [37].

Das Gangliosid  $G_{M1}$  ist ein zuckerhaltiges Lipid. Die Antikörper zum Gangliosid  $G_{M1}$ , also Anti- $G_{M1}$ , werden als Biomarker für Tumore verwendet und sie verursachen das Guillain-Barré-Syndrom, eine entzündliche Stoffwechsel-Störung des Nervensystems [38].

Der Analyt Anti- $G_{M1}$  zählt zu den Immunglobulin G (IgG) Antikörpern, die in der Biosensorik verwendet werden. Die molekulare Struktur von Antikörpern ist klar definiert [39]. Der Antikörper besteht aus zwei antigenbindenden Fragmenten (Fabs) und einem kristallisierten Fragment (Fc). Diese bilden eine Y-Form, wie es in Abb. 2.8 dargestellt ist. Das Fc bindet sich an die funktionalisierte Sensoroberfläche und die

Fabs binden die Antigene. Die Fabs variieren in ihren Sequenzen zwischen den Antikörpern und dadurch ist jeder Antikörper nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip spezifisch für seinen Analyten.

### 2.3.3 Biochemische Schicht

Die Funktionalisierung der Sensoroberfläche besteht aus drei Schritten: Oberfläche reinigen, modifizieren und den Rezeptor auf die Oberfläche immobilisieren. Die Funktionalisierung der Sensoroberfläche wurde am Laboratory of Organic Chemistry an der Wageningen University and Research Centre (Wageningen UR) entwickelt. Der Abstand des Rezeptors zur Sensoroberfläche kann durch Polymerketten vergrößert werden, indem das Protein mit Polyethylenglycol (PEG) funktionalisiert wird, das sogenannte PEGylieren.

Zuerst wird die Oberfläche mit Aceton gereinigt und mit Argon getrocknet. Nach Aktivierung im Sauerstoffplasma wird die Sensoroberfläche für 2,5 min in 2,5 % HF Lösung geätzt und mit Argon getrocknet.

Im Anschluss wird die Sensoroberfläche modifiziert. Abbildung 2.9 zeigt die biochemische Funktionalisierung mit Biotin als Rezeptor. Abbildung 2.10 zeigt die biochemische Funktionalisierung der Sensoroberfläche mit  $G_{M1}$  als Rezeptor.

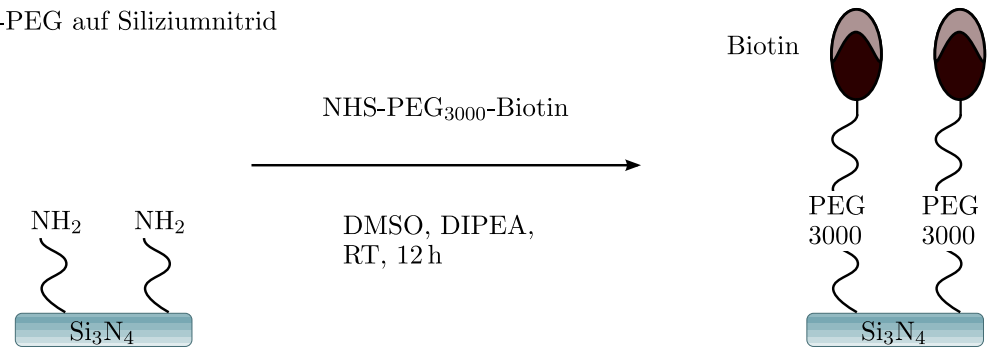
#### Biotinylieren

Das Funktionalisieren der Sensoroberfläche mit dem Rezeptor Biotin wird Biotinylierung genannt. Die Biotinylierung der Siliziumnitrid-Oberfläche wurde an der Wageningen UR entwickelt und von Surfix B.V. auf dem Sensor durchgeführt. Diese biochemische Beschichtung auf Siliziumnitrid ist neu und in Abb. 2.9a dargestellt. Auf die gereinigte Sensoroberfläche wird der Rezeptor NHS-PEG-Biotin mit 3 kDa Molekülmasse immobilisiert. Der Rezeptor wird in Dimethylsulfoxid (DMSO) und Diisopropylethylamin (DIPEA) gelöst. Nach 12 h bei Raumtemperatur bildet sich eine Monolage mit PEGyliertem Biotin.

Eine Alternative ist, den Sensor mit Gold zu beschichten und darauf PEGyliertes Biotin zu immobilisieren. Die Biotinylierung von Gold (Au) beschichteten MEMS-Sensoren ist bekannt [29] [31] und die Komponenten sind kommerziell erhältlich. Die Biotinylierung der Gold beschichteten Sensoren wurde im Rahmen dieser Arbeit selbst durchgeführt. In Abb. 2.9b ist dies schematisch dargestellt.

## 2 Theoretische Grundlagen

### a) Biotin-PEG auf Siliziumnitrid



### b) Biotin-PEG auf Gold

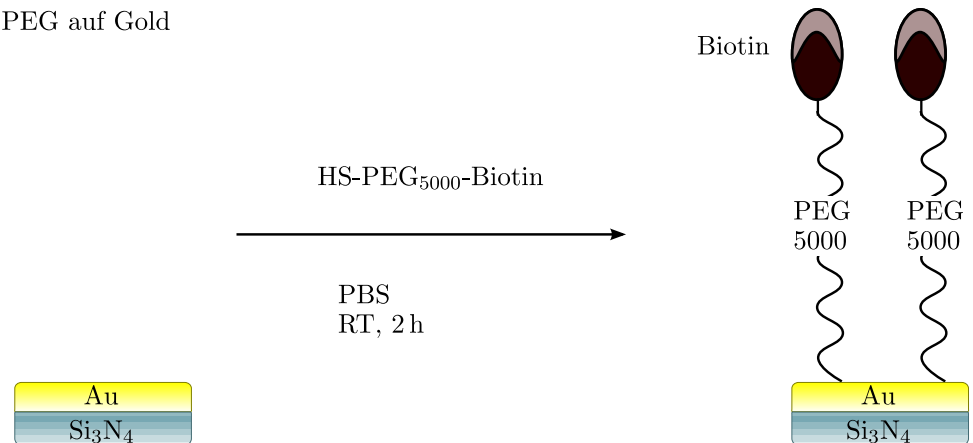


Abbildung 2.9: Biotinylierung der (a) Siliziumnitrid-Oberfläche und (b) Gold-Oberfläche des Sensors.

Die Sensoroberfläche wird 20 min mit 1 % Hellmanex in deionisiertem (DI) Wasser bei  $40^\circ\text{C}$  gereinigt. Anschließend wird sie mit Wasser abgespült und unter Stickstofffluss getrocknet.

Auf die gereinigte Sensoroberfläche wird der Rezeptor HS-PEG-Biotin mit 5 kDa Molekülmasse immobilisiert. Der Rezeptor wird in 10 mM Phosphat-gepufferte Salzlösung, engl. phosphate buffered saline (PBS) verdünnt. Nach zwei Stunden Immobilisation bei Raumtemperatur bildet sich eine Monolage mit PEGyliertem Biotin.

### Funktionalisieren mit GM1

Abbildung 2.10a bis Abb. 2.10c aus [40] zeigen die Modifikation der Siliziumnitrid-Oberfläche mit einem Monolayer Pentafluorophenyl Ester (PFP). Trifluoroethanol Esther (TFEE) wird 9 h unter ultravioletter Einstrahlung bei 254 nm auf die Oberfläche terminiert, wie in [41] im Detail beschrieben. Nach der Bestrahlung wird der Sensor mit Dichloromethan gereinigt und mit Argon getrocknet. Auf die TFEE-

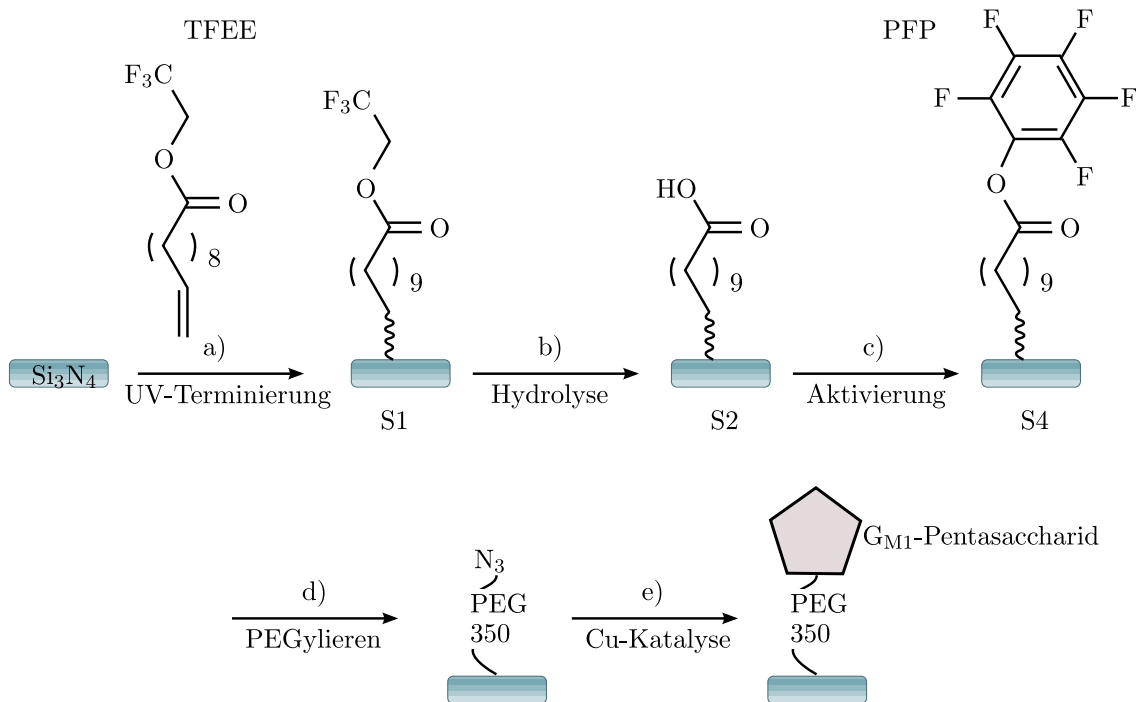


Abbildung 2.10: (a)-(c) Modifikation der Siliziumnitrid-Oberfläche des Sensors, nach [40]. (d)-(e) Immobilisation des Rezeptors an die PFP Monolage auf der Sensoroberfläche.

terminierte Oberfläche wird ein Monolayer durch Hydrolyse mit Kalium-*tert*-butoxid ( $\text{t-BuOK}$ ) in DMSO gebildet. Die Säure-terminierte Oberfläche wird durch PFP in Dichloromethan aktiviert.

Nach Reinigung und Aktivierung der Sensoroberfläche wird  $\text{NH}_2\text{-(PEG)}_6\text{-N}_3$  an das PFP Ester gebunden (Abb. 2.10d). Eine Kupfer-Katalyse bindet das C11-Alkin des Pentasaccharids  $\text{G}_{\text{M1}}$  an die Azidogruppe  $\text{N}_3$  (Abb. 2.10e). An diesem Zucker  $\text{G}_{\text{M1}}$  auf der Siliziumnitrid-Oberfläche des Sensors werden sich  $\text{ctxB}$  und  $\text{Anti-G}_{\text{M1}}$  im Experiment binden.

### 2.3.4 Spezifische Bindung

Die Selektivität des Biosensors ist abhängig von der Oberfläche. Aufgrund der Sensitivität kann der Sensor Massen jeglicher Art detektieren. Die Selektivität findet aber über die spezifische Bindung von Rezeptor und Analyt statt, sodass der Sensor biochemisch beschichtet werden muss. Dies ist in Abb. 2.11 für Streptavidin und in Abb. 2.12 für die Biomarker dargestellt. Das Protein BSA bindet weder an

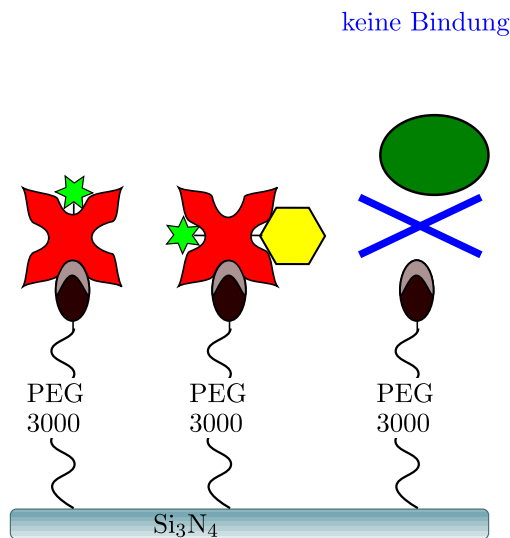


## 2 Theoretische Grundlagen

Biotin noch an  $G_{M1}$ , deshalb wird BSA als negative Probe für beide Experimente verwendet, um die Selektivität des Biosensors nachzuweisen.

### Streptavidin

a) Spezifische Bindung auf Siliziumnitrid



b) Spezifische Bindung auf Gold

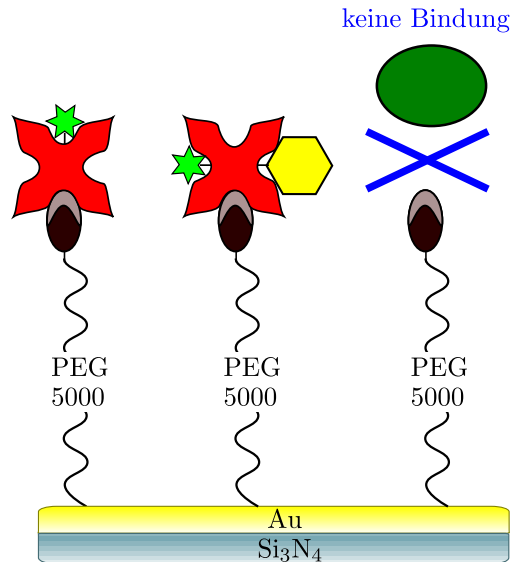


Abbildung 2.11: Selektivität der Proteine auf (a) modifizierter Siliziumnitrid-Oberfläche und (b) modifizierter Gold-Oberfläche.

Die spezifische Bindung von Streptavidin auf Biotinylierten Siliziumnitrid- und Gold-Oberflächen ist in Abb. 2.11 dargestellt. Die biochemische Schicht besteht aus PEGyliertem Biotin und ist über Amino- bzw. Thiolgruppen an die Sensoroberflächen gebunden.

Sowohl mit als auch ohne Goldnanopartikel bindet der Analyt Streptavidin spezifisch an den Rezeptor Biotin, wobei die Proteine jeweils mit demselben Fluoreszenzmarker funktionalisiert sind.

Der Nachweis der spezifischen Bindung erfolgt durch die positiven Proben:

- Analyt Streptavidin bindet an den Rezeptor Biotin,
- mit Gold-Nanopartikeln funktionalisierter Analyt Streptavidin bindet an den Rezeptor Biotin,

und durch die negative Probe:

- Analyt BSA bindet nicht an den Rezeptor Biotin.

## Biomarker

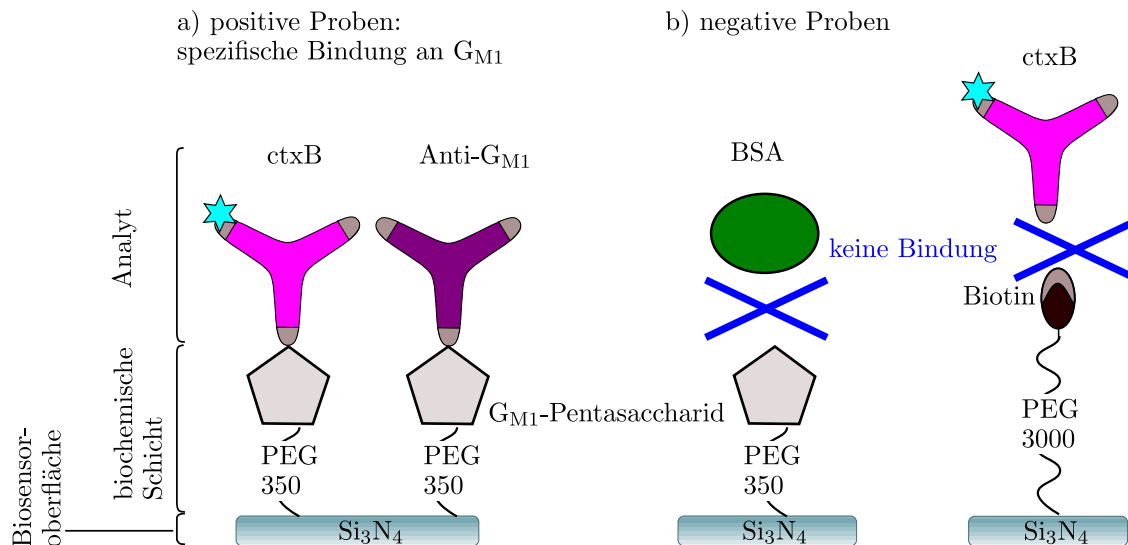


Abbildung 2.12: Selektivität von ctxB und Anti- $G_{M1}$  auf modifizierter Siliziumnitrid-Oberfläche. Nachweis der spezifischen Bindung mit (a) positiven Proben und (b) negativen Proben.

Die spezifische Bindung der Biomarker auf funktionalisierten Siliziumnitrid-Oberflächen ist in Abb. 2.12 dargestellt. Die biochemische Schicht besteht aus PEGyliertem  $G_{M1}$  und ist über die Estergruppe PFP an die Sensoroberfläche gebunden.

Der Nachweis der spezifischen Bindung erfolgt durch zwei Arten von positiven Proben (Abb. 2.12a):

- Analyt ctxB bindet an den Rezeptor  $G_{M1}$ ,
- Analyt Anti- $G_{M1}$  bindet an den Rezeptor  $G_{M1}$ ,

und zwei Arten von negativen Proben (Abb. 2.12b):

- Analyt BSA bindet nicht an den Rezeptor  $G_{M1}$ ,
- Analyt ctxB bindet nicht an den Rezeptor Biotin.

Die Versuchsdurchführung ist in Kapitel 3.4 und die Ergebnisse sind in Kapitel 4.3 beschrieben.

## 2.4 Stand der Technik

### 2.4.1 Massensensitive MEMS-Sensoren

Tabelle 2.1: Stand der Technik von massensensitiven MEMS-Sensoren.

Sensor	Methode	$S$ [Hz/pg]	$\Delta m_{\min}$ [pg]	CMOS ROIC	Quelle
CMUT	kapazitiv	30300		nein	[15]
NIF	piezoelektrisch	0,5	8	nein	[42]
FBAR	piezoelektrisch			ja	[43]
Beam	piezoresistiv	$1 \cdot 10^9$	$7 \cdot 10^{-9}$	nein	[44]
CDR	kapazitiv	12		nein	[18]
CDR	kapazitiv	4,81		nein	[45]
Beam	piezoresistiv	-	-	ja, optisch	[46]
Membran	piezoresistiv	-	-	ja, optisch	[47]

Tabelle 2.2: Stand der Technik von massensensitiven Biosensoren.

Sensor	Methode [MHz]	$S$ [Hz/pg]	$\Delta m_{\min}$ [pg]	CMOS ROIC	Quelle
Cantilever	piezoresistiv	28	6	nein	[48]
CDR	kapazitiv	33	21	nein	[49]
DRP	piezoresistiv	1,46	1460	nein	[50]
Cantilever	piezoresistiv	5,42	0,0034	nein	[51]
Cantilever	piezoresistiv	0,33	0,313	nein	[52]
Cantilever	piezoresistiv	-	-	ja, auf Gold	[53]

Die hier erwähnten massensensitiven MEMS-Resonatoren werden nach der Funktionsmethode ihres mechanischen Sensorelements kategorisiert in [25]

- piezoresistiv,
- piezoelektrisch,
- kapazitiv.

Die Massensensitivität  $S$  und die kleinste experimentell nachgewiesene Masse  $\Delta m_{\min}$  sind für massensensitive MEMS-Sensoren (Tab. 2.1) und Biosensoren (Tab. 2.2) tabellarisch dargestellt.

### Piezoresistive Sensoren

Piezoresistive MEMS-Sensoren, zu denen der aus der Rasterkraftmikroskopie bekannte Cantilever gehört, sind die einfachste Art der massensensitiven Sensoren. Die meist rechteckige Sensorfläche ist an einem Ende (Cantilever) bzw. an zwei oder mehr Ecken (Beam) befestigt. Wird die Sensorfläche ausgelenkt, erzeugt dies eine Änderung in der Impedanz. Aufgrund ihrer kleinen Sensorfläche haben piezoresistive Sensoren hohe Eigenfrequenzen und erreichen dadurch Massensensitivitäten bis in den Zeptogrammbereich [44]. Zusätzlich können auf kleiner Fläche Arrays von Sensoren individuell funktionalisiert und so Referenzsensoren erzeugt werden [54]. Cantilever werden im Post-Prozess für die Immobilisation von Avidin/Streptavidin auf Biotin mit Gold beschichtet und die Auslenkung statisch [31] oder die Resonanz dynamisch gemessen [52].

### Piezoelektrische Sensoren

Piezoelektrische MEMS-Sensoren sind bulk acoustic wave (BAW) Sensoren und non-interdigitated comb finger (NIF). Der meistverbreitete massensensitive BAW Sensor ist die Quarzkristall-Mikrowaage (QCM) als piezoelektrischer Aktuator und wird zur Detektion von akustischen Wellen in Flüssigkeiten verwendet [55] [43]. NIF besitzen aufgrund ihrer parametrischen Resonanz eine höhere Frequenz und entsprechend höhere Sensitivitäten [42].

### Kapazitive Sensoren

Kapazitive MEMS-Sensoren bestehen aus zwei Elektroden, die einen Kondensator bilden. Die flexible Elektrode wird elektrostatisch zur Resonanz angeregt und deren Auslenkung wird elektrisch gemessen. Dazu gehören capacitive micromachined ultrasonic transducer (CMUT) [15], circular diaphragm resonator (CDR) [45] und der Drucksensor in dieser Arbeit.

In der Gruppe von Dr. Khuri-Yakub wird der CMUT zur Detektion von Gasmolekülen verwendet [15]. Er ist aufgrund der runden, flexiblen, dünnen Membran dem Drucksensor dieser Arbeit ähnlich und dient daher als Vorlage. Park et al. hat

## 2 Theoretische Grundlagen

Platin auf die Sensorfläche eines 0,5  $\mu\text{m}$  dünnen CMUT aufgetragen und für die gesamte Sensorfläche  $A$  eine Sensitivität von nur  $S^{-1}/A = 13 \text{ pg/Hz/cm}^2$  ermittelt, was bei einer Resonanzfrequenz von 18,2 MHz umgerechnet eine Sensitivität von 30300 Hz/pg ergibt [15]. Weitere Massensensitivitäten pro Fläche sind im Vergleich zu anderen MEMS-Sensoren in Tab. 2.3 aufgelistet.

Tabelle 2.3: Stand der Technik der Massensensitivität pro Fläche von massensensitiven MEMS-Sensoren.

Sensor	Methode	$S^{-1}/A$ [pg/Hz/cm <sup>2</sup> ]	Quelle
CMUT	kapazitiv	13	[15]
FBAR	piezoelektrisch	3	[43]
Beam	piezoresistiv	0,3	[44]
Drucksensor	kapazitiv	66,7	diese Arbeit

Der Drucksensor soll CMOS-integriert und als Biosensor verwendet werden. Ein Beispiel aus der aktuellen Forschung ist der kapazitive CDR Sensor, der in der Gruppe von Dr. McNeil vom Funktionsprinzip [56] bis zur Integration einer Mikrofluidik [57] und Elektronik auf Leiterplatte, engl. printed circuit board (PCB) [58] entwickelt wurde. Die Sensorfläche des CDR ist jedoch für die Immobilisation der Biomoleküle mit Gold bedeckt und die Ausleseschaltung ist (noch) nicht CMOS-integriert.

### 2.4.2 CMOS-Integration

Die CMOS-Integration der massensensitiven Sensoren ist durch die gemeinsame Herstellung von Elektronik und Sensor einfacher als Biosensoren in CMOS zu integrieren, da die Immobilisation von Biomolekülen neben einer biokompatiblen Sensoroberfläche auch chemisch stabile Elektroden erfordert [59]. Viele massensensitive MEMS-Sensoren werden im CMOS-Prozess hergestellt und bestehen deshalb aus denselben Materialien wie die CMOS-ROIC [7]. Siliziumnitrid ist biokompatibel [60] und wird standardmäßig in MEMS-Sensoren verwendet. Ein Post-Prozess von chemisch stabilen und biokompatiblen Schichten wie Gold [53] kann dadurch vermieden werden und reduziert die Kosten in der Herstellung.

Erarslan et al. hat einen CMOS-integrierten Sensor aus einem Array von resonanten Membranen hergestellt, aber der Sensor wird nicht elektrisch ausgelesen, sondern

optisch [47]. Das hat zwei Nachteile für den CMOS: die Ausleseelektronik ist nicht auf dem Sensorchip integriert und im Post-Prozess wird eine reflektierende Schicht auf den Sensor aufgetragen.

Die CMOS-Integration des massensensitiven Sensors muss also für den Nachweis von Allergenen und Biomarkern die folgenden Herausforderungen erfüllen:

- kosteneffiziente Herstellung durch gemeinsame Herstellung im CMOS-Prozess und Verzicht auf Post-Prozess biokompatibler Materialien,
- Platzersparnis durch CMOS-ROIC und elektrische statt optische Messung,
- biokompatible Sensoroberfläche und chemisch stabile Elektroden.

Zusätzlich muss der Sensor eine Massensensitivität im Pikogrammbereich haben, um die Masse von Allergenen und Biomarkern nachzuweisen, die an der Sensoroberfläche haften bleiben.

## 3 Experimente

Dieses Kapitel beschreibt den Aufbau und die Durchführung der Experimente. Kapitel 3.1 gibt eine Übersicht über die Untersuchungsmethoden und die Integrationen in das Messsystem.

Die Messmethoden werden in Kapitel 3.2 kurz beschrieben.

Die detaillierten Untersuchungsmethoden und die Präparation der Proben für das Auflösungsvermögen und die Selektivität werden in Kap. 3.3 bzw. 3.4 beschrieben. Auf die Integration der Ausleseelektronik und die Erweiterung des Messsystems mit fluidischen Elementen wird in Kap. 3.5 eingegangen.

### 3.1 Übersicht

Tabelle 3.1: Übersicht über das Probenmaterial, die Methoden der Adhäsion auf den Sensor und die Ziele der Untersuchungsmethoden.

Probe	Methode	Ziel
dünne Goldschichten	physikalisch abscheiden	Sensor kalibrieren
Partikel	pipettieren	Untersuchungsmethode wählen
Biomoleküle	pipettieren	Selektivität nachweisen

Das Prinzip des Messsystems ist in Abb. 3.1 dargestellt. Eine Messreihe am Biosensor besteht aus:

- (a) Resonanzfrequenz messen,

- (b) Adhäsion der Biomoleküle an die Sensoroberfläche,
- (c) Spülen und Trocknen,
- (d) Resonanzfrequenz erneut messen.

Die Adhäsionszeit muss groß genug sein, dass sich das Biomolekül an den biochemisch beschichteten Sensor bindet. Das Spülen soll die nicht gebundenen Biomoleküle und die Salze fortspülen. Aufgrund der Dämpfung durch die Flüssigkeit ist es erforderlich, dass die Messung im Trockenen durchgeführt wird.

In der vorliegenden Arbeit werden ein Messsystem entwickelt, der Sensor kalibriert und verschiedene Untersuchungsmethoden für die Adhäsion auf den Sensor verglichen. Dafür werden unterschiedliche Methoden und Proben verwendet (Tab. 3.1).

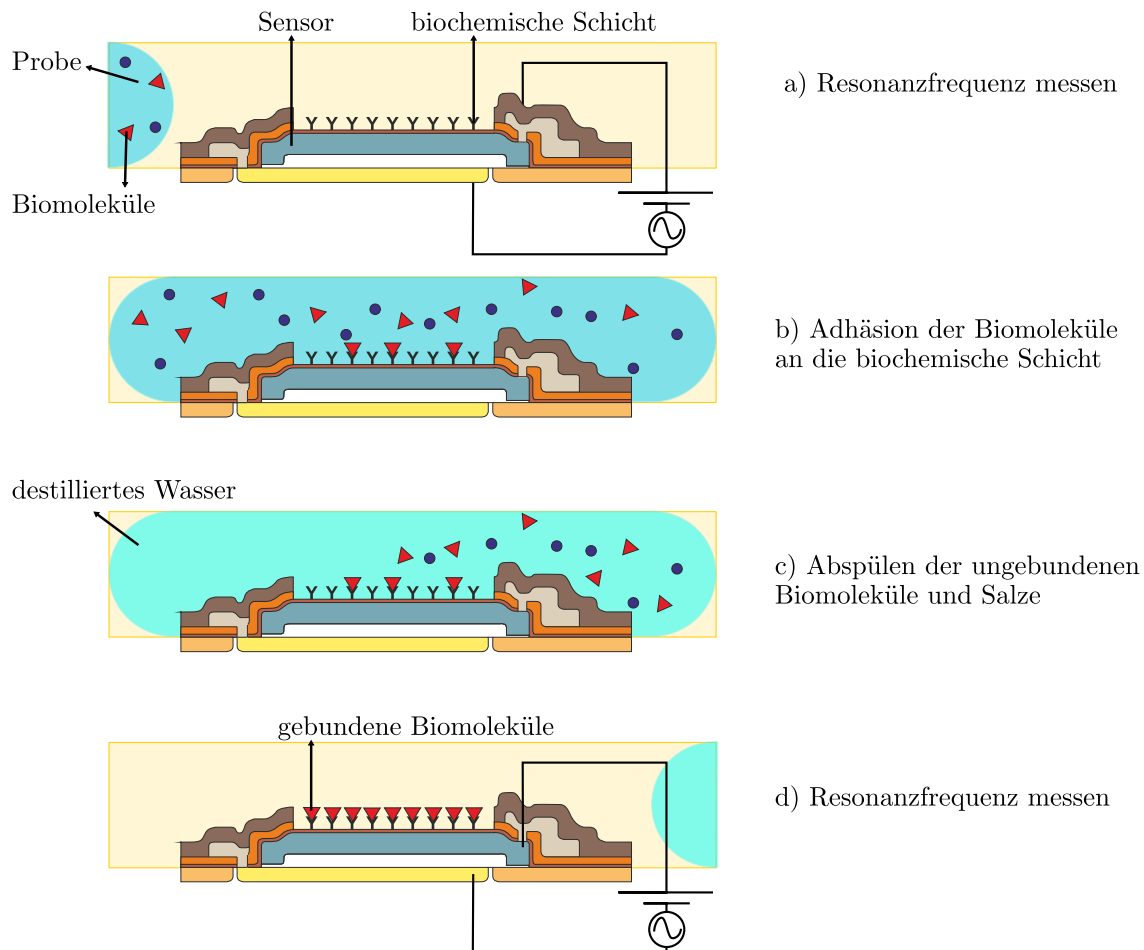


Abbildung 3.1: Funktionsprinzip des Messsystems.



### 3 Experimente

Der kapazitive Sensor wird auf sein Auflösungsvermögen in Bezug auf Massensensitivität untersucht. Das Ziel ist, ein Auflösungsvermögen des Sensors im Pikogrammbe-  
reich zu erreichen. In dieser Größenordnung befinden sich typischerweise die Massen  
der Nanopartikel und Biomoleküle, wenn sie die gesamte Fläche des Sensors belegen.  
Dafür wird in dieser Arbeit ein Messsystem entwickelt, das den Sensor elektrosta-  
tisch zur Resonanz anregt und ausliest. Die Resonanzfrequenz wird automatisch  
detektiert.

#### 3.1.1 Untersuchungsmethoden

Die Untersuchungsmethoden sind für die Kalibration des Sensors in Abb. 3.2 und  
für die Selektivität in Abb. 3.3 schematisch dargestellt. Die Abbildungen zeigen,  
dass das Hinzufügen einer Masse eine negative Frequenzverschiebung bewirkt und  
daraus die Massensensitivität des Sensors ermittelt wird. Die hinzugefügten Massen  
sind hier exemplarisch mit dünnen Goldschichten bzw. Biomolekülen dargestellt,  
deren Präparation auf die Sensoren und die Charakterisierung in Kap. 3.3 und in  
Kap. 3.4 beschrieben sind.

#### Kalibration des Sensors

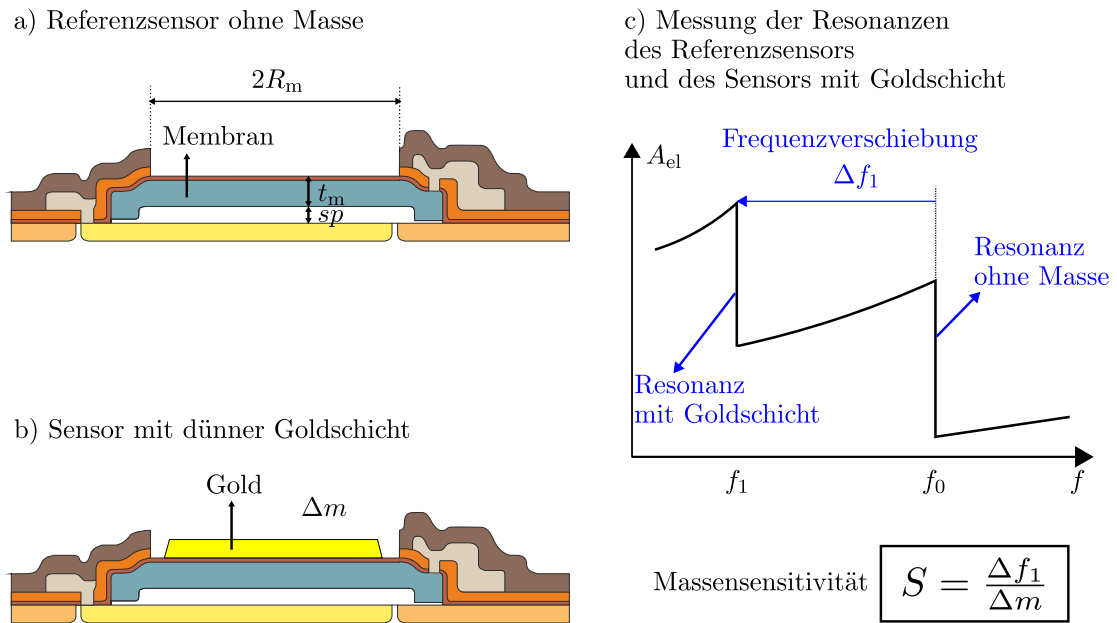


Abbildung 3.2: Methode zur Kalibration des Sensors.

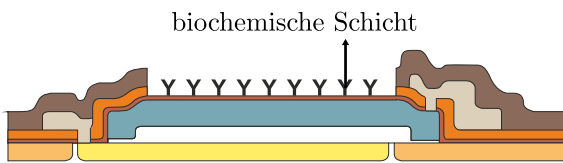
Der Sensor in Abb. 3.2a wird als Referenz verwendet. Ein zweiter Sensor ist mit  
einem dünnen Goldfilm beschichtet (Abb. 3.2b). Die Resonanzfrequenzen beider

Sensoren werden detektiert (Abb. 3.2c). Die zusätzliche Masse bewirkt im Vergleich zum Referenzsensor eine negative Frequenzverschiebung  $\Delta f_1$ .

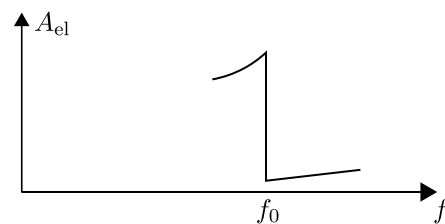
Das Volumen der anorganischen Probe wird vermessen und die Masse bestimmt. Aus der Masse der Probe  $\Delta m$  und der Differenz  $\Delta f_1$  wird die Massensensitivität  $S = \Delta f_1 / \Delta m$  bestimmt.

### Selektivität des Sensors

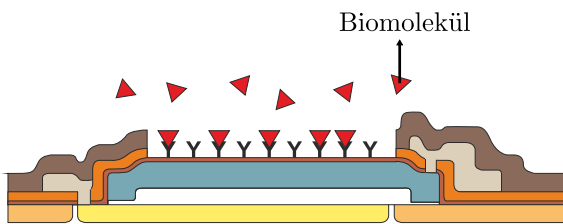
a) Sensor mit biochemischer Schicht



b) Messung der Resonanz des Sensors ohne Biomolekül



c) Sensor mit Biomolekülen



d) Messung der Resonanz des Sensors mit Biomolekül

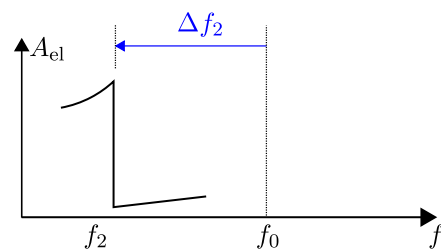


Abbildung 3.3: Methode zur Selektivität am Biosensor.

Dasselbe Prinzip der Massenänderung wird für die Untersuchung der Selektivität verwendet. Dies ist am Beispiel von Biomolekülen in Abb. 3.3 dargestellt. Die Biomoleküle sollen auf dem Sensor haften bleiben, weshalb der Sensor in Abb. 3.3a biochemisch beschichtet ist. Anders als bei der Kalibration des Sensors werden im Hinblick auf die Selektivität die Resonanzfrequenzen an demselben Sensor gemessen. Dies hat den Grund, dass der gesamte Sensorchip biochemisch beschichtet ist und somit kein Referenzsensor zur Verfügung steht, an dem sich die Biomoleküle nicht binden. Die Resonanzfrequenz wird vor (Abb. 3.3b) und nach (Abb. 3.3d) Bindung der Biomoleküle an dem Sensor gemessen. Die zusätzliche Masse der Biomoleküle auf dem Sensor (Abb. 3.3c) bewirkt eine negative Frequenzverschiebung um  $\Delta f_2$  (Abb. 3.3d).

#### 3.1.2 Adaptersystem und Integrationen in das Messsystem

Der grundlegende Aufbau besteht aus einem Sensor bzw. einem Sensorpaar, einer Signal- und einer Ausleseelektronik. Das Messsystem soll die folgenden Anforderungen erfüllen:

- Sensor charakterisieren,
- Resonanzfrequenzen automatisch messen,
- Aufbau miniaturisieren,
- Probenvolumen reduzieren.

Der Sensor wird mit dem grundlegenden Aufbau charakterisiert. Um die oben genannten Anforderungen zu erfüllen, wird das Messsystem mit den folgenden Erweiterungen optimiert: Ein LabVIEW Programm wird entwickelt, das die Resonanzfrequenzen automatisch misst und auswertet. Für die Miniaturisierung wird die Ausleseschaltung auf den Sensorchip integriert und eine Mikrofluidik entwickelt. Zusätzlich wird das Probenvolumen durch die Entwicklung einer Fluidik reduziert. Ein Adaptersystem wird für die verschiedenen Anwendungen speziell entwickelt und ist im folgenden Abschnitt beschrieben.

Das grundlegende Adaptersystem besteht aus zwei Teilen: der Platine mit fest montiertem Sensorchip (Abb. 3.4a) und dem Adapterboard mit Buchsen und Steckverbindern (Abb. 3.4b). Die Platine wird in den Steckverbinder des Adapterboards geschoben, sodass der Sensorchip jeweils ausgetauscht werden kann (Abb. 3.4c).

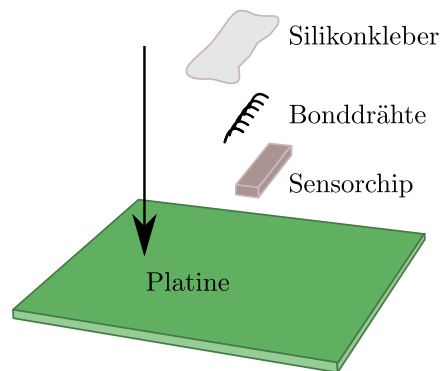
Auf die Platine in Abb. 3.4a wird der Sensorchip mit Silikonkleber geklebt. Bonddrähte verbinden den Sensorchip und die Platine elektrisch. Sensorchip, Bonddrähte und Platine werden von Silikon Globtop verschlossen, sodass der Sensor frei bleibt, aber die elektrischen Kontakte gegen Kurzschluss geschützt sind.

Die elektrischen Kontakte und Leiterbahnen auf der Platine bestehen aus Gold. Außer an den Kontakten ist die Platine mit Lack gegen Kurzschluss geschützt. Eine in die Platine integrierte Massefläche unterhalb des Sensorchips und der Leiterbahnen schützt das hochfrequente Signal vor parasitären elektromagnetischen Einflüssen.

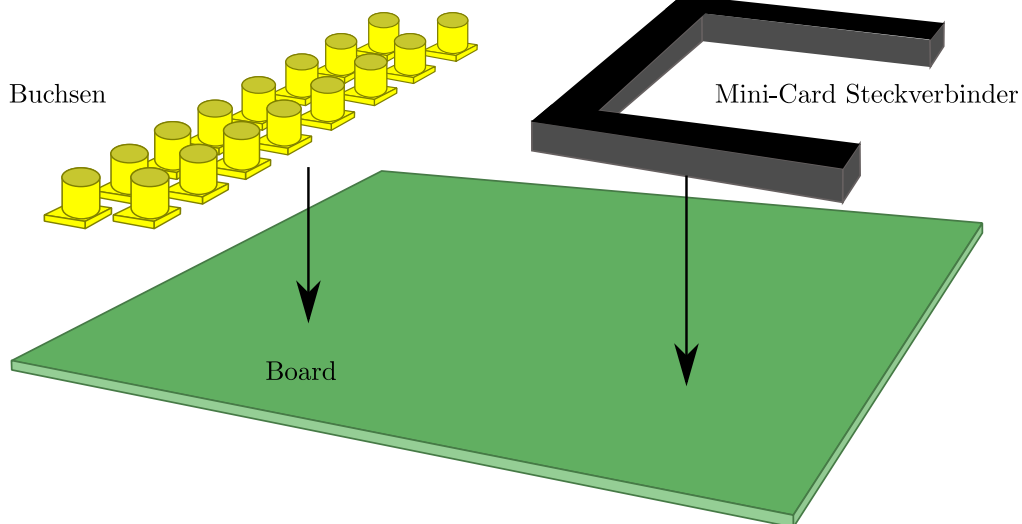
An der Unterseite der Platine befinden sich elektrische Kontakte für die Verbindung zum Adapterboard. Die Platine hat das Layout einer Mini Card, die im Allgemeinen als Speicherkarte verwendet wird. Der Mini Card Steckverbinder ermöglicht das

### 3.1 Übersicht

a) Sensorchip fest auf Platine montieren und Bonddrähte mit Silikon verschließen



b) Steckverbinder und Buchsen fest auf Adapterboard montieren



c) Platine in den Steckverbinder schieben

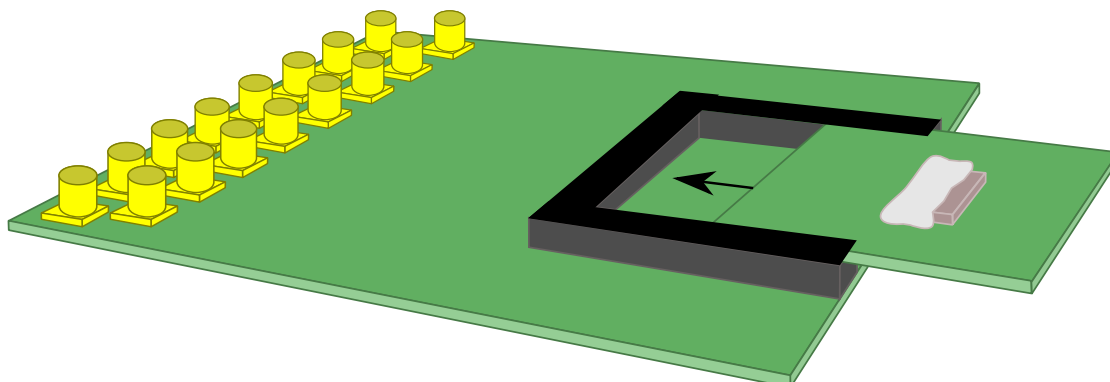


Abbildung 3.4: Schematische Darstellung des Adaptersystems. (a) Montage des Sensorchips auf die Platine. (b) Aufbau des Adapterboards. (c) Vollständiges Adaptersystem.

### 3 Experimente

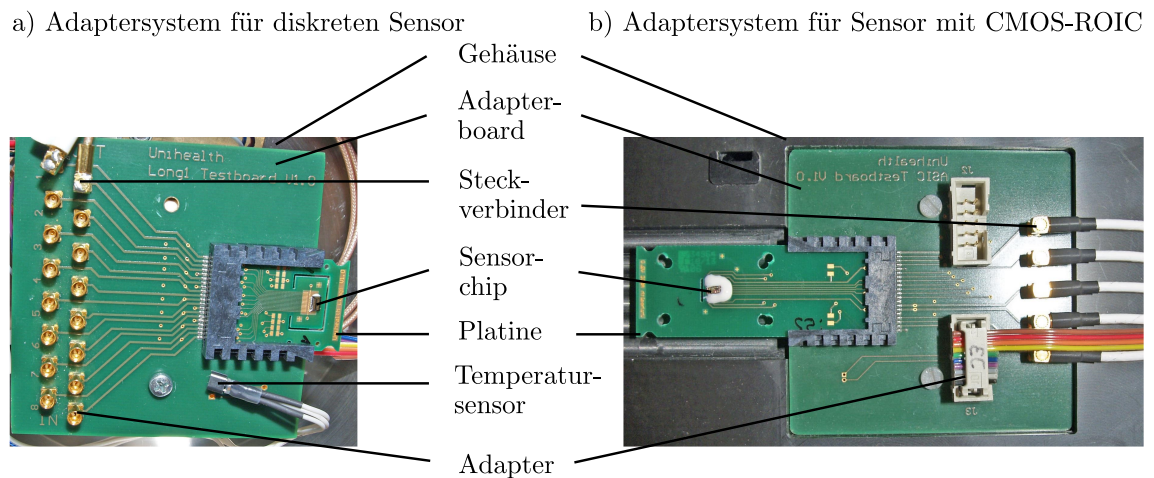


Abbildung 3.5: Adaptersysteme für (a) diskreten Sensor und (b) Sensor mit CMOS-integrierter Ausleseschaltung.

einfache Austauschen der Platine.

Auf dem Adapterboard in Abb. 3.4b sind die Buchsen und der Mini Card Steckverbinder gelötet. Wie bei der Platine auch, bestehen die elektrischen Kontakte und Leiterbahnen aus Gold. Zur Platzersparnis auf dem Adapterboard werden MMCX Stecker und Buchsen verwendet.

Das Adapterboard gibt es in zwei Ausführungen: für den diskreten Sensor und für den Sensor mit CMOS-ROIC, der in Kap. 3.5 beschrieben ist. Die Adapterboards unterscheiden sich dabei an den montierten Buchsen, siehe Abb. 3.5.

Die Platinen sind in drei unterschiedlichen Längen entwickelt worden. Die Breite ist gleich geblieben, um in den Steckverbinder des Adapterboards zu passen. Kurze Platinen passen für die Charakterisierung des Sensors in ein vakuumversiegeltes Gehäuse (Abb. 3.5a) und unter den Nanodispenser, der in Kap. 3.3 beschrieben ist. Für die Fluidik wurden die Platinen verlängert (Abb. 3.5b). Das Adapterboard wird auf den Deckel eines schwarzen Gehäuses montiert (Abb. 3.5b), unter dem Elektronik und Fluidik verborgen werden.

Sowohl für die Fluidik als auch für die Mikrofluidik ist die Position des Sensorchips angepasst worden.

Der diskrete Sensor kann auch ohne aufwändige Montage direkt über Tastkopfnadeln elektrisch kontaktiert und schnell ausgetauscht werden. Deshalb werden Untersuchungen der Sensitivität und Selektivität an diskreten Sensoren durchgeführt.

## 3.2 Versuche zum Resonanzverhalten des Sensors

### 3.2.1 Simulationen

Im Rahmen dieser Arbeit wird der Sensor charakterisiert, sein dynamisches Verhalten untersucht und mit den Simulationsergebnissen ([13] und [19]) verglichen. Aus diesem Grund werden die Simulationen an dieser Stelle noch einmal erläutert.

Zwei Arten von Simulationen werden zur Charakterisierung des Sensors durchgeführt: Finite-Elemente-Methode (FEM) und Lumped-Parameter-Modell (LPM) (vgl. Goehlich et al. [13] und [19]). Die FEM-Simulation gibt eine quantitative Aussage über die Eigenfrequenz und Sensitivität des Sensors. Die LPM-Simulation gibt eine qualitative Aussage über das dynamische Verhalten der elektrischen Amplitude. Beide Modelle verwenden die elektrostatische Anregungskraft  $F_{\text{el}}$ . Die FEM berücksichtigt zwar die Elektrostatik und die mechanische Biegesteifigkeit der Sensormembran, aber um das dynamische Verhalten zu verstehen, ist auch die Kenntnis von der Position der Membran nötig [9]. Deshalb wird im LPM die Bewegungsgleichung zeitabhängig integriert, mittels Runge-Kutta Verfahren gelöst und in Form der Auslenkung und des elektrischen Stroms dargestellt.

#### Finite-Elemente-Modell

Tabelle 3.2: Materialeigenschaften der Sensormembran für die FEM-Simulation.

	Polysilizium	Siliziumnitrid
$t_m$ [nm]	1100	135
$E$ [GPa]	160	250
$\nu$	0,22	0,23

Für die FEM-Simulation wurde die Software COMSOL verwendet. Die Ergebnisse ergeben eine genauere Aussage über die Eigenfrequenz und Sensitivität. In den Gleichungen Gl. 2.2 und 2.4 wurde das Modell einer runden, am Rand fixierten Sensormembran verwendet. Da jedoch der Rand der Sensormembran nicht starr befestigt ist und dadurch eine zusätzliche Biegesteifigkeit besitzt, wird für die FEM Simulation ein komplexeres Modell verwendet. Der kapazitive Drucksensor bildet einen Plattenkondensator mit starrer unterer Elektrode und einer beweglichen oberen Elektrode (Abb. 3.6a). Die obere Elektrode ist eine runde Sensormembran mit Radius  $R_m$  und Dicke  $t_m$ . Sie besteht aus 1100 nm dickem Polysilizium und ist von

### 3 Experimente

a) Sensor im Querschnitt

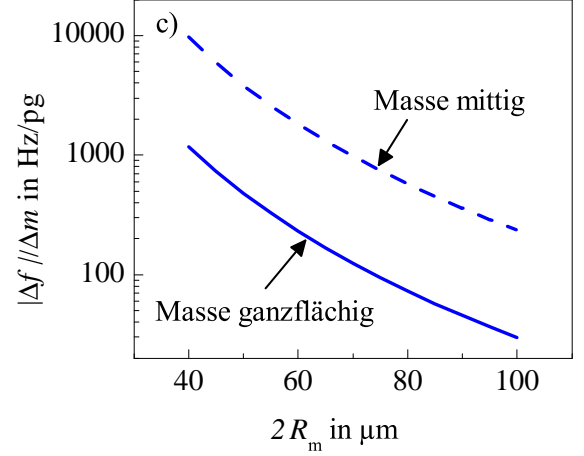
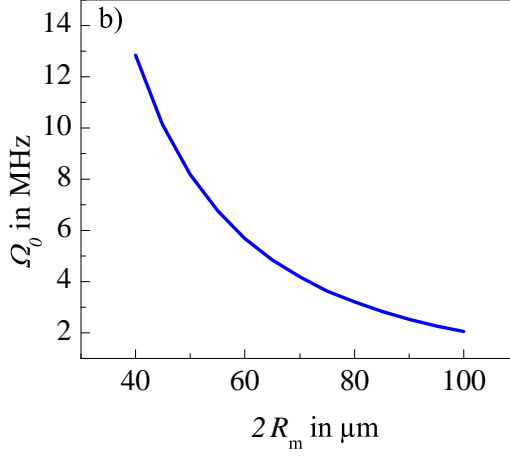
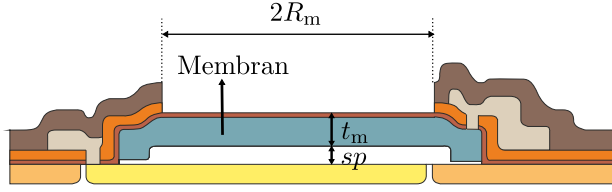


Abbildung 3.6: FEM-Simulation des kapazitiven Drucksensors. (a) Modell des MEMS-Sensors im Querschnitt. Simulationsergebnisse (b) der Eigenfrequenz und (c) der Sensitivität, nach [19].

135 nm Nitrid bedeckt. In Tabelle 3.2 sind die verwendeten Parameter für Schichtdicke  $t_m$ , Elastizitätsmodul  $E$  und Poissonzahl  $\nu$  aufgelistet.

Die Sensormembran wird durch die elektrostatische Kraft  $F_{el}$  zur Oszillation angeregt. Die mechanische Oszillation der Sensormembran wird mit der FEM simuliert, um die Eigenfrequenzen und Sensitivitäten für unterschiedliche Sensordurchmesser zu berechnen und aufzutragen (Abb. 3.6b und c) [19]. Dabei werden für die Bestimmung der Sensitivität zwei Szenarien simuliert: Die Masse ist mittig (gestrichelte Linie) und die Masse ist ganzflächig (durchgezogene Linie) verteilt. Die experimentell erwartete Sensitivität muss also im Pikogrammbereich dazwischen liegen.

Die transiente Berechnung ist auch im FEM möglich, aber im LPM schneller durchzuführen. Deshalb wird im folgenden Abschnitt die LPM-Simulation erläutert.

#### Lumped-Parameter-Modell

In Kapitel 2.2 wurden die theoretischen Grundlagen erläutert, die zur Simulation des dynamischen Verhaltens benötigt werden. Mit Hilfe des elektromechanischen

### 3.2 Versuche zum Resonanzverhalten des Sensors

Modells und der Bewegungsgleichung wird das dynamische, zeitabhängige Verhalten der harmonischen Resonanzkurve simuliert, um die elektrischen Spannungen abzuschätzen. Die Reduzierung auf ein eindimensionales Modell und die Annäherung an einer festen Biegelinie im LPM ermöglichen eine schnellere Simulation für die qualitative Aussage als mit der FEM [13]. Im Vergleich dazu hat Ladabaum et al. in seinem Modell für den CMUT mit runder Membran statt der festen Biegelinie eine feste sinusförmige Zeitabhängigkeit angenommen [21], die ortsabhängige Resultate liefert und von Mason eingeführt wurde [61].

Die Bewegungsgleichung 2.6 wird mittels Runge-Kutta Verfahren numerisch gelöst. Dafür werden die Integrale der elektrostatischen Kraft in Gl. 2.10 und des elektrischen Stroms in Gl. 2.12 analytisch berechnet und in Form der Auslenkung (Abb. 3.7a) und der Amplitude (Abb. 3.7b) des elektrischen Stroms dargestellt.

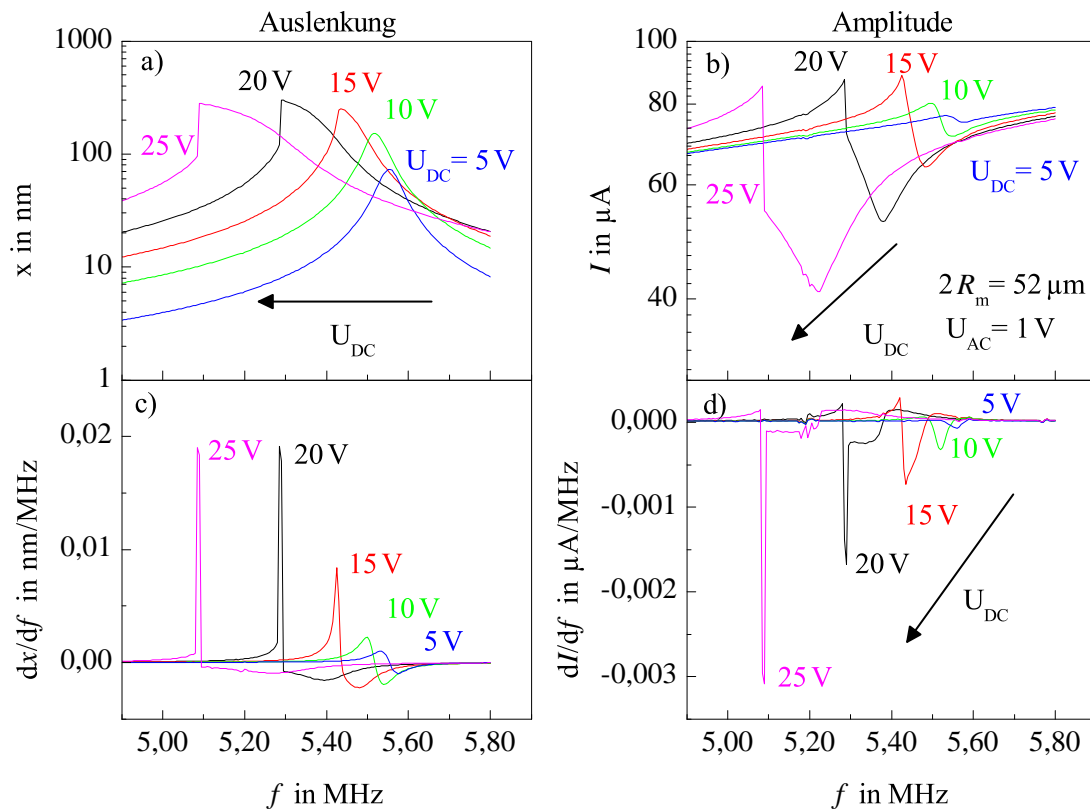


Abbildung 3.7: LPM-Simulationsergebnisse (a) der Auslenkung und (b) des elektrischen Stroms, nach [19]. (c)-(d) Ableitungen zur Bestimmung der Resonanzfrequenzen aus den Extremstellen.



### 3 Experimente

Der Sprung in der Resonanzkurve entsteht durch den nichtlinearen Term der Auslenkung  $x(r, t) = x_0(t)f(r)$  in der elektrostatischen Kraft (Gl. 2.10). Wird der Term entwickelt, entsteht eine Nichtlinearität in der Bewegungsgleichung, die einen Sprung in der Auslenkung erzeugt. Die zeitabhängige Auslenkung  $x_0(t)$  und daraus der Strom  $I(t)$  werden im LPM analytisch berechnet und dargestellt.

Aufgrund des Sprungs in der Auslenkung ist der Sprung auch in der Amplitude des elektrischen Stroms zu erkennen. Die Position des Amplitudensprungs ergibt die Resonanzfrequenz, die zur experimentellen Bestimmung der Massensensitivität wichtig ist.

Die mechanische Bewegung (Abb. 3.7a) und der elektrische Strom (Abb. 3.7b) wurden bei einer Wechselspannung von  $U_{AC} = 1\text{ V}$  und zu Biasspannungen von 5 V bis 25 V simuliert [19]. Die Ableitungen dazu sind in Abb. 3.7c und 3.7d aufgetragen.

Die Amplitude der Auslenkung in Abb. 3.7a zeigt für  $U_{DC} = 5\text{ V}$  eine typische Resonanzkurve, wie sie in Kap. 2.2 beschrieben ist: An der Stelle der Resonanz  $\Omega_0$  ist die Auslenkung maximal.

In Abb. 3.7b zeigt die elektrische Amplitude bei kleiner Biasspannung von 10 V die typische runde Form, die durch das BvD-Modell [9] beschrieben wird.

Die Amplitude bei  $U_{DC} = 25\text{ V}$  zeigt aufgrund der Nichtlinearität einen Amplitudensprung an der Stelle der Resonanzfrequenz. Die Ableitung der simulierten Amplitude (Abb. 3.7d) zeigt an dieser Stelle einen schmalen Peak. Wegen dieses schmalen Peaks ist die Extremstelle bei  $U_{DC} = 25\text{ V}$  leichter zu bestimmen als bei  $U_{DC} = 10\text{ V}$ . Deshalb wird der Sensor für eine höhere Frequenzauflösung und entsprechend hoher Sensitivität im anharmonischen Bereich betrieben.

In diesem Abschnitt wurden die theoretisch erwarteten Ergebnisse der Eigenfrequenzen und der Massensensitivität ermittelt und das dynamische Verhalten bei Variation der elektrischen Spannungen beschrieben.

Die statischen FEM-Simulationen ergeben, dass die Resonanzfrequenz im Megahertzbereich und die Massensensitivität im Pikogrammbereich erwartet werden und vom Sensordurchmesser abhängig sind, was in Kap. 4 mit experimentellen Ergebnissen verglichen wird. Die Sensoren mit kleinen Durchmessern werden aufgrund ihrer kleinen Masse sensitiver und besitzen eine höhere Eigenfrequenz.

Die zeitabhängigen LPM-Simulationen ergeben, dass die Auslenkungen im Nanometerbereich zu erwarten sind und dass die Form und Position der Auslenkung durch die Biasspannung aufgrund der Nichtlinearität und des Spring-Softening Effekts verändert werden. Da der elektrische Strom aus der Auslenkung berechnet wird, zeigt

auch die Amplitude einen Sprung bei hoher Biasspannung. Dieser erzeugt einen schmalen Peak in der Ableitung und ermöglicht es so, über Extremstellenbestimmung die Resonanzfrequenz zu ermitteln und die Auflösung zu erhöhen.

Die Auslenkung und die Amplitude werden elektrisch und optisch untersucht und mit den simulierten Ergebnissen in Kap. 4.1 verglichen.

#### 3.2.2 Elektrostatisches Anregen und Auslesen des Sensors

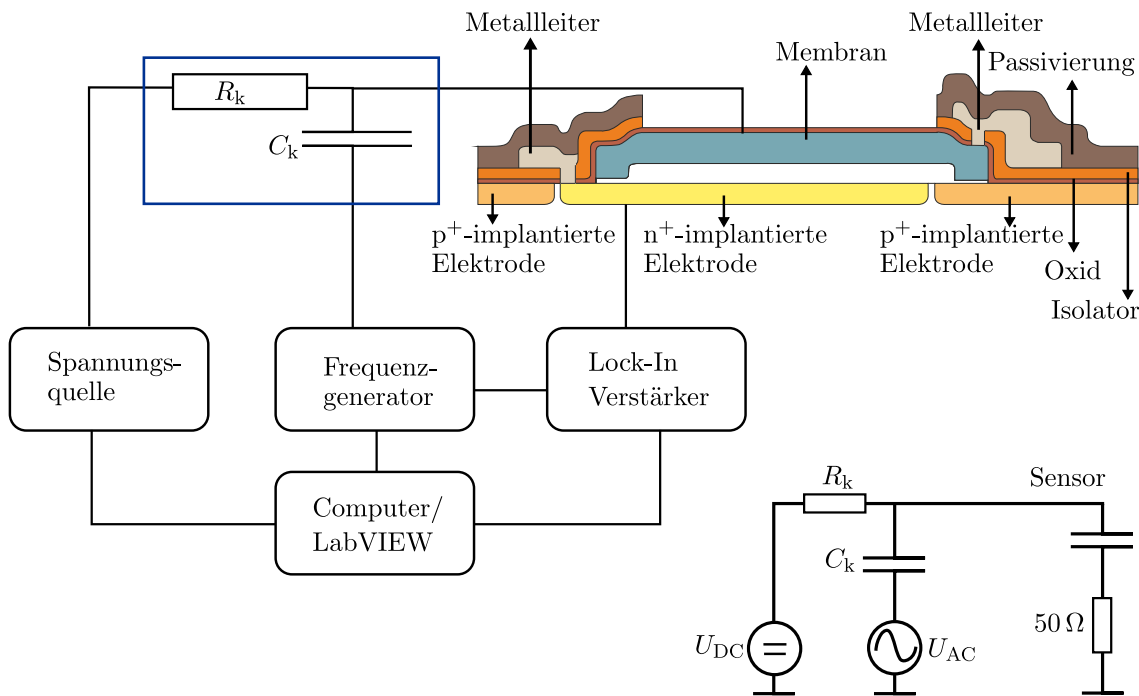


Abbildung 3.8: Schematische Zeichnungen des Experiment Setups und des Schaltplans. Grundlegender Versuchsaufbau mit Sensor, Anregungs- und Ausleseelektronik, nach [62].

Der grundlegende Versuchsaufbau zum elektrostatischen Anregen und Auslesen des Sensors ist mit dem Schaltplan in Abb. 3.8 dargestellt. Er besteht aus Sensor, Anregungs- und Ausleseelektronik.

Der Sensor ist ein kapazitiver Drucksensor, der elektrostatisch zur Oszillation angeregt wird. Eine Elektrode ist die Polysilizium Membran, die andere Elektrode ist im Substrat implantiert und n<sup>+</sup> dotiert. Die implantierte p<sup>+</sup> Elektrode dient zum Schutz vor parasitären elektromagnetischen Einflüssen.

Eine Gleichspannungsquelle HM8142 von Hameg liefert die Biasspannung. Das si-

### 3 Experimente

nusförmige Signal wird über einen Frequenzgenerator angeregt. Als Frequenzgeneratoren wurden sowohl ein DS345 von Stanford Research als auch ein 33220A von Agilent verwendet.

Beide Spannungen werden über fünf serielle Widerstände von je  $R_k = 18\text{ k}\Omega$  und parallele Kondensatoren von je  $C_k = 100\text{ nF}$  gekoppelt. Das gekoppelte Signal liegt zwischen den Elektroden des kapazitiven Drucksensors an.

Die Ausleseelektronik ist auf der Grundlage eines Bandpassfilters mit Verstärker aufgebaut. Für die Charakterisierung des diskreten Sensors wird ein Lock-In Verstärker SR488 von Stanford Research verwendet. Der Verstärker ist auf die Generatorfrequenz gelockt. Die Integration findet über einen 12 dB Filter mit einer Integrationszeit von 1 ms bis 100 ms statt.

Die Ermittlung der Resonanzfrequenz aus der Extremstellenbestimmung wird von dem Messprogramm automatisch durchgeführt. Die elektrische Spannung wird gemessen und deren elektrische Amplitude wird differenziert. Die Extremstelle wird bestimmt und in Abhängigkeit von der Messzeit dargestellt. So können Änderungen der Resonanzfrequenz sofort visualisiert werden.

#### 3.2.3 Laserinterferometrie

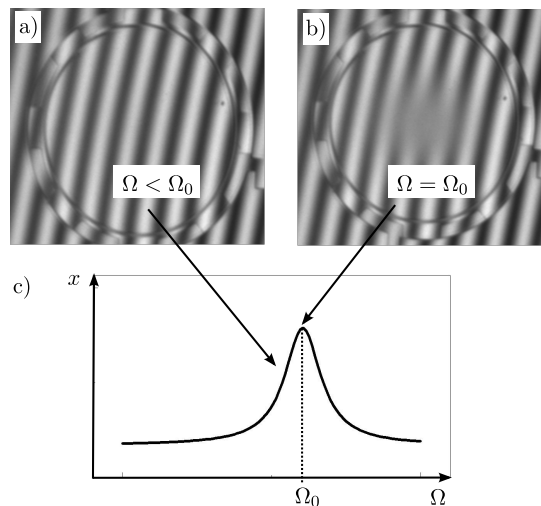


Abbildung 3.9: Prinzip der Laservibrometrie. Interferenzmuster auf einem Sensor vor (b) und nach (c) der Resonanzfrequenz. (c) Frequenzscan.

Für die optische Messung des Sensors wird ein Photomap 3D Laserinterferometer der Firma FOGALE nanotech verwendet. Zum einen wird das Profil mit weißem

### 3.2 Versuche zum Resonanzverhalten des Sensors

Licht bzw. monochromatischem Licht auf der Grundlage eines Michelson-Morley-Interferometers gemessen. Zum anderen wird das dynamische Verhalten von MEMS-Sensoren optisch durch ein Laser-Doppler-Vibrometer untersucht [63].

Wegen der dynamischen Bewegung des Sensors ändern sich Weg und Geschwindigkeit des zurückgestreuten monochromatischen Lichts. Durch den Doppler-Effekt wird die dynamische Änderung des Sensors detektiert. Die Überlagerung mit einem Referenzstrahl erzeugt einen Phasenunterschied zwischen beiden Lichtstrahlen. Dies erzeugt ein Interferenzmuster im Interferometer (Abb. 3.9a). An der Stelle der Resonanz wird die Interferenz gestört (Abb. 3.9b).

Ähnlich wie bei den elektrischen Messungen wird der Sensor durch einen Frequenzgenerator elektrostatisch ausgelenkt. Die Frequenz der sinusförmigen Anregungsspannung wird von 1 MHz bis maximal 2 MHz durchgefahren. Die Amplitude der Auslenkung wird gemessen (Abb. 3.9c). Die optisch gemessene Resonanzfrequenz wird mit der elektrischen verglichen. Aufgrund des eingeschränkten Frequenzbereichs sind nur Vergleichsmessungen an den Sensoren mit 96  $\mu\text{m}$  möglich.

### 3.3 Versuche zum Auflösungsvermögen des Sensors

Dieses Kapitel beschreibt die Versuchsdurchführung zur Bestimmung des Auflösungsvermögens des Sensors. Anorganische Proben werden auf den Sensor aufgebracht und bewirken eine Frequenzverschiebung, wie in Kap. 3.1 beschrieben. Die Kalibration der Sensitivität wird mit abgeschiedenen dünnen Goldschichten durchgeführt. Mit Nanopartikeln und Mikrokugeln werden verschiedene Methoden während der Messung untersucht, die in Kap. 3.4 auf den Biosensor angewendet werden. Die Präparation der anorganischen Proben auf den Sensor und die Durchführung der Experimente werden im Folgenden beschrieben. Die Ergebnisse sind in Kap. 4.2 erläutert.

#### 3.3.1 Präparation anorganischer Proben

##### Dünne Goldschichten

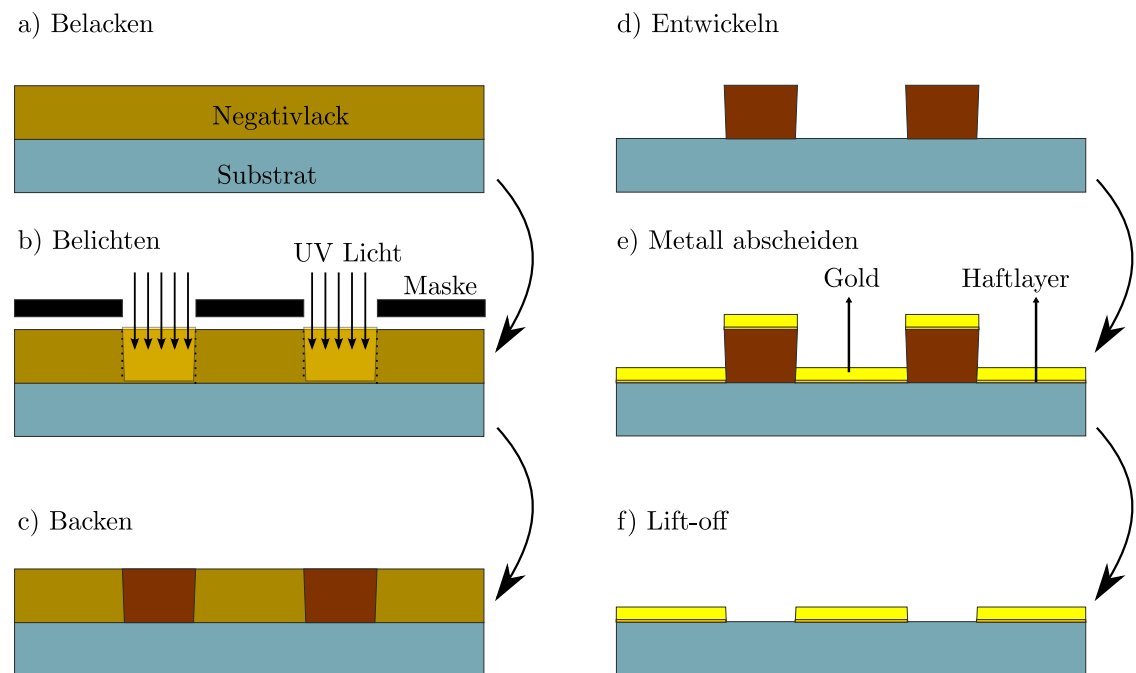


Abbildung 3.10: Präparation der dünnen Goldschichten.

Für die Kalibration des Sensors werden dünne Goldschichten im Postprozess auf den Wafer physikalisch abgeschieden. Die Präparation der dünnen Goldschichten erfolgt

### 3.3 Versuche zum Auflösungsvermögen des Sensors

mit Fotolithografie, physikalischer Abscheidung und anschließendem Lift-off Prozess (Abb. 3.10).

Der Wafer wird mit einem Negativlack der Serie AZ<sup>®</sup> nLOF2020 von MicroChemicals beschichtet (Abb. 3.10a). Während der Belichtung tritt ultraviolettes Licht mit  $60 \text{ mJ/cm}^2$  Energiedosis an den Stellen durch die Maske, die nicht metallisiert werden sollen (Abb. 3.10b).

Die belichteten Bereiche des Lacks werden bei  $110^\circ\text{C}$  60 s quervernetzt (Abb. 3.10c). Dies ist notwendig, um den Lack im nasschemischen Ätzverfahren vom Substrat zu lösen.

Anschließend wird beim Entwickeln der nichtbelichtete Lackbereich im Entwickler AZ<sup>®</sup> 826 MIF aufgelöst. Der belichtete Lack bleibt nach dem Ausbacken und dem Entwickeln auf dem Substrat (Abb. 3.10d). Spülen mit deionisiertem Wasser stoppt die Entwicklung. Nach dem Lithografie Prozess wird der Wafer in vier Teile gesägt, um gesputterte Goldschichten für die Kalibration des Sensors zu verwenden und um den Lift-off Prozess an thermisch aufgedampften Strukturen zu untersuchen.

Ein viertel Wafer wird am Institut für Werkstoffe der Elektrotechnik, Lehrstuhl Mikrostrukturintegration an der Universität Aachen weiter prozessiert. Dort werden 10 nm Titannitrid als Haftlayer und 50 nm Gold aufgesputtert (Abb. 3.10e). Anschließend wird der Lack und das darauf abgeschiedene Metall im Lift-off Verfahren nasschemisch vom Substrat gelöst (Abb. 3.10f). Dafür wird der viertel Wafer mit der prozessierten Seite nach unten für 24 h in  $80^\circ\text{C}$  heißes 1-methyl-2-pyrrolidone (NMP) getaucht. Im Anschluss wird der Wafer mit DI Wasser, Aceton und Isopropanol gereinigt.

Der viertel Wafer wird entlang des Ritzrahmens zu  $1,8 \times 3,2 \text{ mm}^2$  großen Sensorchips gesägt. Diese werden für die Kalibration des Sensors verwendet.

Während die dünnen Goldschichten für die Kalibration des Sensors auf dem ersten Probenstück hergestellt werden, wird der Lift-off Prozess auf den bereits strukturierten Drucksensoren untersucht. Hierfür werden die drei verbliebenen Waferstücke vor der Metallabscheidung zu  $1,8 \times 3,2 \text{ mm}^2$  großen Sensorchips gesägt und auf  $25 \times 35 \text{ mm}^2$  große Glassubstrate geklebt.

Das thermische Verdampfen von Titannitrid und Gold auf die Sensorchips wird vom Zentrum für Halbleitertechnik und Optoelektronik, Lehrstuhl für Halbleitertechnik/Halbleitertechnologie an der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

Anschließend werden der Lack und das darauf abgeschiedene Metall im Lift-off Verfahren nasschemisch vom Substrat gelöst. Um Redeposition des Metalls zu vermei-

### 3 Experimente

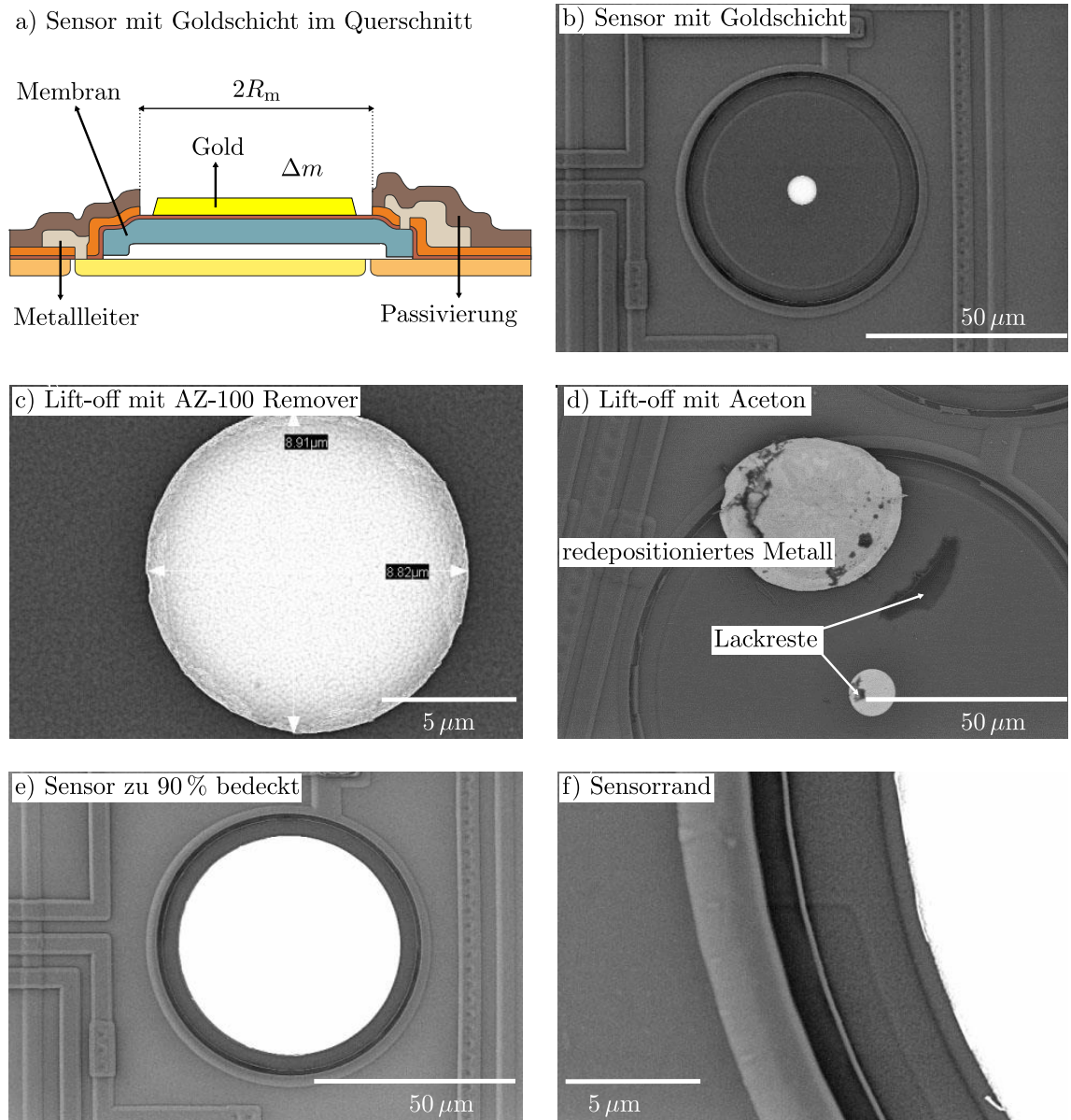


Abbildung 3.11: REM Aufnahmen von dünnen Goldschichten auf dem Sensor zu unterschiedlichem Lift-off Verfahren. (a) Schematische Darstellung des Sensors mit Gold im Querschnitt. (b) Goldschicht gesputtert und Lack mit NMP nasschemisch gelöst. (c)-(d) Goldschicht thermisch aufgedampft und Lack mit (c) AZ-100 Remover bzw. (d) Aceton nasschemisch gelöst. (e)-(f) Goldschicht gesputtert und Lack mit NMP nasschemisch gelöst, dabei ist der Sensor zu 90 % mit 50 nm dünnem Gold bis zum Rand der Membran (f) bedeckt.

### 3.3 Versuche zum Auflösungsvermögen des Sensors

den, wird die prozessierte Seite nach unten gerichtet und das Lösemittel mit einem Magnetrührer in Bewegung gehalten. Hierfür werden die Sensorchips in eine chemiebeständige Teflonhalterung eingebaut. Die Teflonhalterung ist so konstruiert, dass die Sensorchips sicher in eingefrästen Kammern liegen, während das Lösemittel hindurchfließen kann.

Statt des giftigen NMP werden Aceton bei 40 °C und AZ-100 Remover bei 60 °C als Lösemittel getestet und die Ergebnisse im Mikroskop untersucht. Nach mindestens zwei Stunden im Lösemittel werden die Sensorchips mit Isopropanol abgespült und unter Stickstofffluss getrocknet.

Anschließend werden die Goldschichten auf den Sensoren im Rasterelektronenmikroskop (REM) untersucht und die Ergebnisse aus den Lift-off Verfahren werden miteinander verglichen (Abb. 3.11).

Abbildung 3.11a und 3.11c zeigen runde Goldschichten mit 8,9 µm Durchmesser auf Sensoren mit 60 µm Durchmesser. Abb. 3.11e zeigt einen Sensor mit 60 µm Durchmesser, der zu 90 % mit 50 nm dünnem Gold bis zum Rand der Membran (Abb. 3.11f) bedeckt ist. Die REM Aufnahmen zeigen, dass die runde Form gelungen ist und die Goldschicht sich in der Mitte des Sensors befindet.

Es ist deutlich zu sehen, dass der Lift-off in Aceton nicht gelungen ist, da Redeposition und abgerissene Flanken vorhanden sind (Abb. 3.11d). Auch ist das Metall am Rand des Sensorchips nicht vollständig entfernt.

Die Lift-off Verfahren mit NMP und AZ-100 Remover sind gelungen. Weder Einrisse in der Goldflanke noch Lackreste sind weder am Goldrand noch um die Sensormembran zu erkennen.

### Nanopartikel und Mikrokugeln

Tabelle 3.3: Eigenschaften der präparierten Nanopartikel und Mikrokugeln.

	Nanopartikel	Mikrokugeln
Analyt	CdSe-Nanopartikel	Polysterene Latex Mikrokugeln
Hersteller	RU Nijmegen	Sigma Aldrich
Probengröße [nm]	5-10	1000-1200
Puffer	Wasser	Isopropanol
Sensoroberfläche	Si <sub>3</sub> N <sub>4</sub>	Si <sub>3</sub> N <sub>4</sub>
Konzentration [µg/ml]	497	100



### 3 Experimente

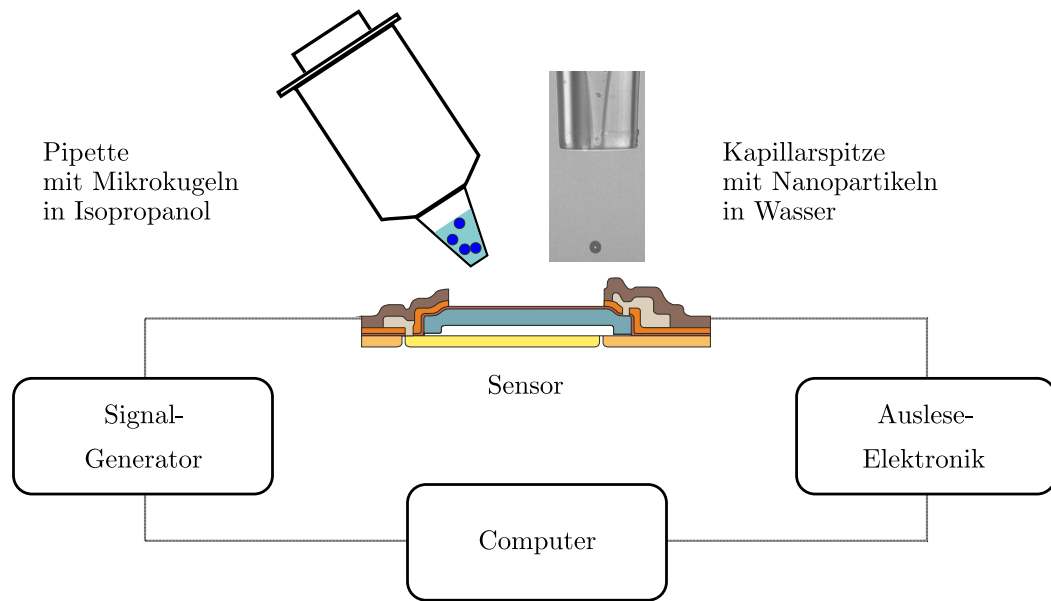


Abbildung 3.12: Schematische Zeichnung des Experiments. Die Mikrokugeln und Nanopartikel werden mit einer Pipette bzw. dem Nanodispenser auf den Sensor pipettiert.

Die Methode zur Positionierung der Proben auf den Sensor während der Messungen wird mit Nanopartikeln und Mikrokugeln untersucht und in Kap. 3.4 verwendet. Dies ist in Abb. 3.12 schematisch dargestellt.

Für die ersten Versuche werden die Sensoren nicht biochemisch beschichtet. Stattdessen werden die Proben direkt auf die Sensoroberfläche pipettiert und nicht abgespült. Das bedeutet, dass sich die Partikel aufgrund des Coffee-Ring Effekts beim Verdunsten des Tropfens an den Tropfenrand ablagern. Deshalb ist es notwendig, dass die Proben in Flüssigkeiten verdünnt werden, die rückstandsfrei verdunsten und dass die Proben in kleinen Tropfen zielgenau auf den Sensor pipettiert werden. Dies wird mit Nanopartikeln und Mikrokugeln getestet.

Tabelle 3.3 stellt die Eigenschaften der anorganischen Proben dar, die auf die Sensoren pipettiert werden.

Die Polyesterene Latex Mikrokugeln LB11 werden von der Firma Sigma Aldrich bezogen. Sie haben einen Durchmesser von  $1100 \pm 100$  nm.

Die CdSe-Nanopartikel sind in einer wässrigen Lösung von der Radboud Universität Nijmegen zur Verfügung gestellt worden. Die Stammlösung mit einer Konzentration von  $497 \mu\text{g/ml}$  wird unverdünnt für das Experiment verwendet. Die Nanopartikel haben einen Durchmesser von 5 nm bis 10 nm.

### 3.3 Versuche zum Auflösungsvermögen des Sensors

Die Mikrokugeln werden zu einer Konzentration von  $100\text{ }\mu\text{g/ml}$  in Isopropanol verdünnt. Tropfen mit  $1\text{ }\mu\text{l}$  Volumen werden manuell mit einer Eppendorf Pipette auf den Sensorchip pipettiert. Die Nanopartikel werden unverdünnt mit einem Nanodispenser pipettiert.

Im folgenden Abschnitt ist das Positionieren der Nanopartikel mit dem Nanodispenser während der laufenden Messung näher erläutert.

#### Positionierung der Nanopartikel mit dem Nanodispenser

- a) Übersichtsfoto des Nanodispensers mit Adaptersystem    b) Kapillarspitze aus Glas

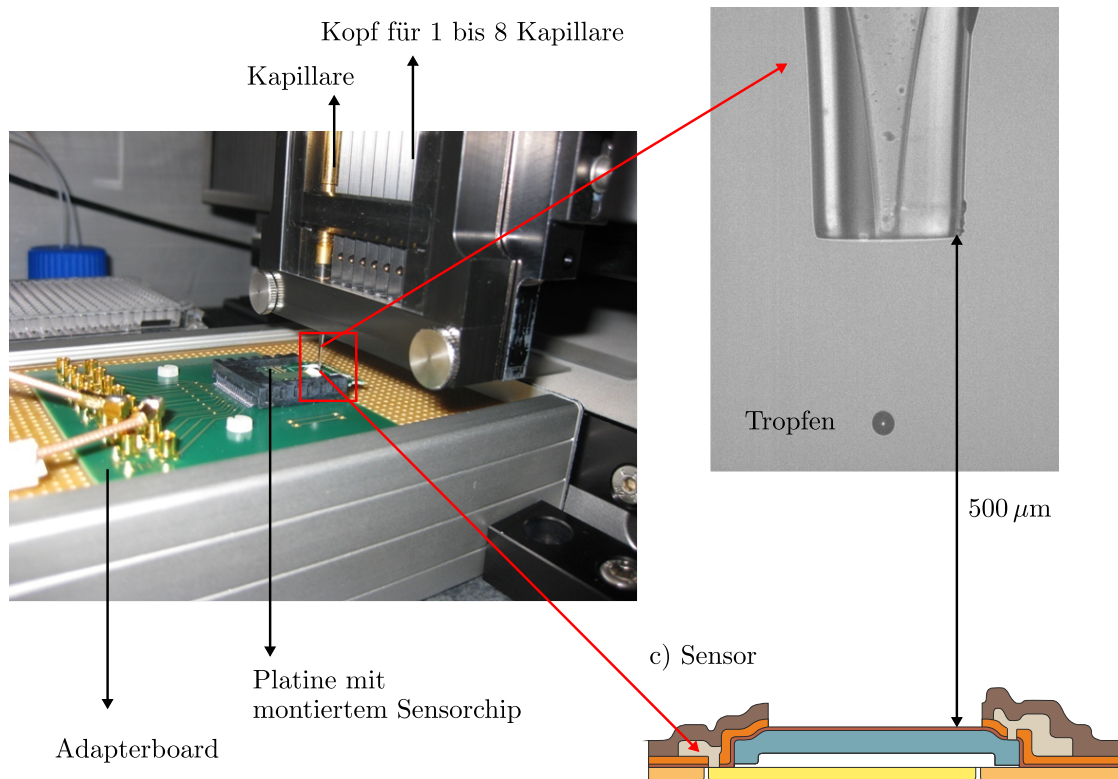


Abbildung 3.13: Adaptersystem am Nanodispenser.

In Abb. 3.13 ist das Adaptersystem zur Präparation der Nanopartikel auf den Sensor schematisch dargestellt. Dazu wird ein sciFLEXARRAYER S3 der Firma Scienion verwendet, der Tropfen in der Größe von unter einem Nanoliter kontaktlos über piezobetriebene Dosierpumpen pipettiert. Wegen der Tropfengröße wird der sciFLEXARRAYER auch Nanodispenser genannt.

Abbildung 3.13a zeigt ein Foto der Kapillare über dem montierten Sensorchip. Das

### 3 Experimente

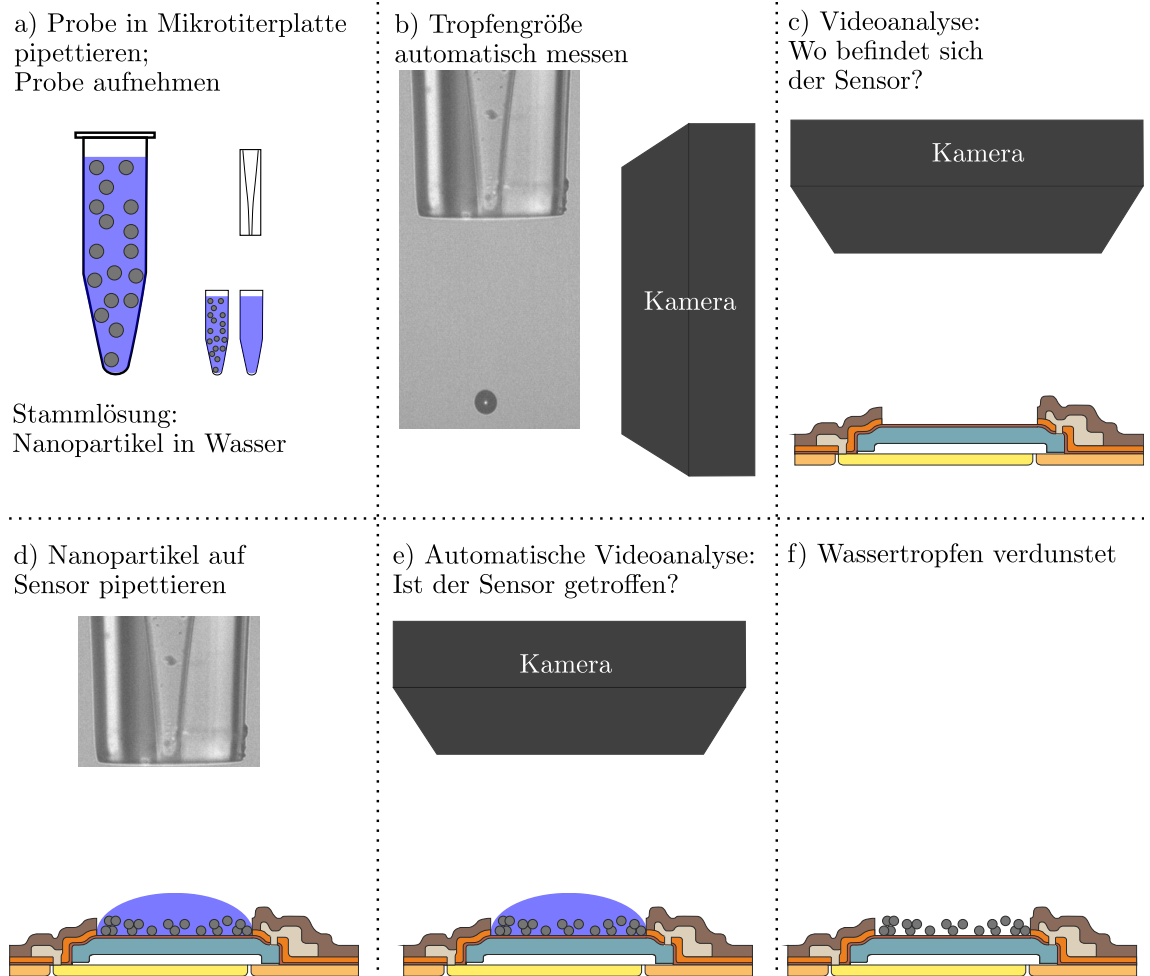


Abbildung 3.14: Kontaktfreies Pipettieren von Nanopartikeln mit dem Nanodispenser.

Adaptersystem mit Sensorchip und Platine, die in den Steckverbinder des Adapterboards geschoben wird, ist in Kap. 3.1 beschrieben.

Die Kapillare besteht aus einer Glasspitze mit Metallgehäuse und einem Schlauchende. Bis zu acht dieser Kapillaren können im Kopf des Nanodispensers eingebaut werden. Der Kopf des Nanodispensers wird über Schrittmotoren mit einer Genauigkeit von  $5\text{ }\mu\text{m}$  in x-, y- und z-Richtung gefahren.

Zwischen Kapillarspitze und Sensor ist ein Abstand von etwa  $500\text{ }\mu\text{m}$ . Der Tropfen wird auf den Sensor pipettiert. Eine integrierte Kamera nimmt die Kapillarspitze von der Seite auf, um das Tropfenvolumen zu messen und die Kapillarspitze (Abb. 3.13b) auf Agglomerationen zu prüfen.

### 3.3 Versuche zum Auflösungsvermögen des Sensors

Die Oberfläche der Kapillare ist für optimales Pipettieren beschichtet. Laut Hersteller hat der Tropfen eine Präzision von unter  $5\text{ }\mu\text{m}$  und einen Durchmesser ab  $80\text{ }\mu\text{m}$ , wenn er auf eine Oberfläche trifft. Dabei ist ein typisches Tropfenvolumen von 50 pl bis 800 pl möglich, abhängig von der verwendeten Glaskapillare und den Einstellungen. Das Tropfenvolumen der verwendeten Kapillare wurde vom Hersteller auf 300 pl bis 360 pl kalibriert. Die Koordinaten und die Spannung des Dispensers werden solange angepasst, bis der Sensor zielgenau getroffen wird.

Das kontaktfreie Pipettieren der Nanopartikel ist in Abb. 3.14 schematisch dargestellt. Die Nanopartikel im Wasser werden unverdünnt in eine Mikrotiterplatte pipettiert. Aus der Mikrotiterplatte entnimmt der Nanodispenser die Probe (siehe Abb. 3.14a). Vor einer seitlichen Kamera in Abb. 3.14b wird eine Tropfengröße von 360 pl gemessen und fünf Tropfen werden auf den Sensor pipettiert. Dies entspricht einem Tropfenvolumen von  $0,0018\text{ }\mu\text{l}$ . Eine Kamera ist neben der Kapillare befestigt. Mit der Kamera wird automatisch vor (Abb. 3.14c) und nach (Abb. 3.14e) dem Pipettieren geprüft, wo sich der Sensor befindet und ob der Sensor getroffen wurde. Der Wassertropfen verdunstet innerhalb von wenigen Sekunden (Abb. 3.14f). Im Anschluss wird die Kapillare ausgewaschen.

Der gesamte Zyklus, von der Probenaufnahme bis zur Reinigung der Kapillare, läuft automatisch und ist individuell programmierbar. Bevor die Nanopartikel dispensiert werden, wird mit DI Wasser die Position des Tropfens auf dem Sensor geprüft und gegebenenfalls werden die Parameter angepasst.

#### 3.3.2 Charakterisierung

##### Dünne Goldschichten

Gold ist ein vielseitiges Edelmetall, das für Biosensoren verwendet wird [31] [52] [64]. Wegen der Unverträglichkeit im CMOS-Prozess kann Gold nur im Post-Prozess auf den fertigen Sensor abgeschieden werden. Die elektrischen Kontakte bestehen deshalb aus Aluminium, überstehen aber nicht die Prozesse zur biochemischen Beschichtung [59]. Das Edelmetall ist hingegen chemiebeständig und elektrisch leitend, weshalb es hier für verschiedene Zwecke verwendet wird:

- als Passivierung zum Schutz der elektrischen Kontakte (Abb. 3.15a),
- als zusätzliche Masse zur Kalibration des Sensors (Abb. 3.15a),
- als chemisch stabile Sensoroberfläche für den Biosensor (Abb. 3.15b).

### 3 Experimente

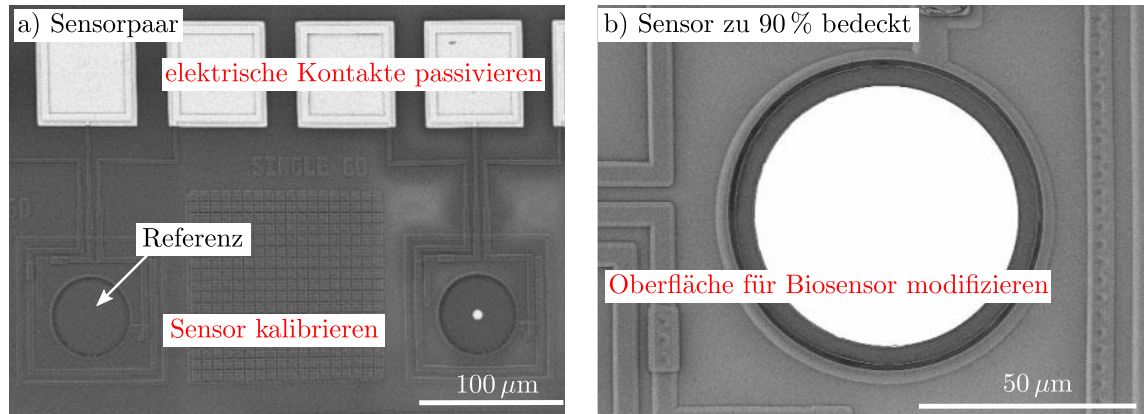


Abbildung 3.15: REM Aufnahmen der Goldschichten mit verschiedenen Durchmessern auf Sensoren mit 60 µm Durchmesser.

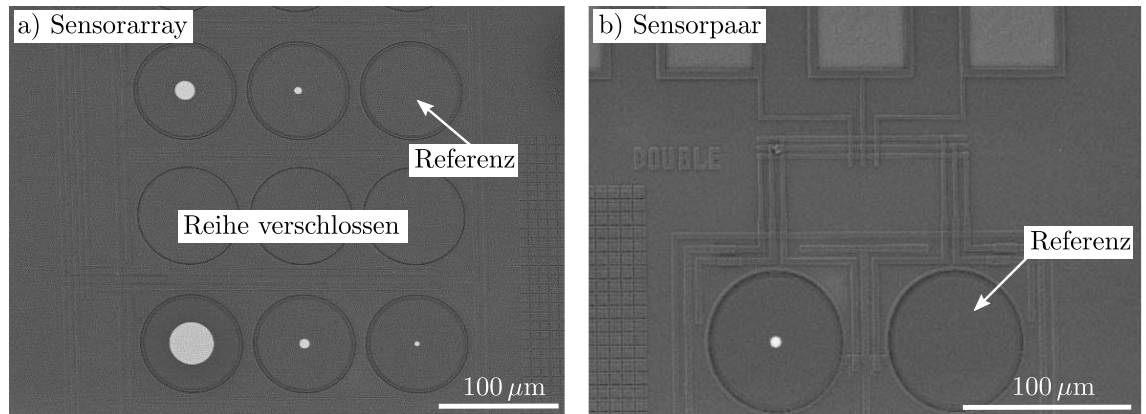


Abbildung 3.16: REM Aufnahmen der Goldschichten mit verschiedenen Durchmessern auf Sensoren mit 96 µm Durchmesser.

Die Sensoren werden mit dünnen Goldschichten als zusätzliche Masse kalibriert. Runde Goldschichten mit Durchmessern im Mikrometerbereich werden auf der Mitte der Sensormembran abgeschieden, um Massen im Pikogrammbereich zu erreichen und daraus die Massensensitivität zu bestimmen. Das Layout der Hellfeld Maske ist dabei auf die fertigen Sensoren angepasst. Für die Kalibration werden sowohl die Anzahl der Sensoren als auch die Durchmesser der Goldschichten variiert (Abb. 3.16). Auf einem Array von Sensoren sind runde Goldschichten mit Durchmessern von 5 µm bis 45 µm abgeschieden (Abb. 3.16a). Diese Schichten haben unterschiedliche Massen und bewirken dadurch unterschiedlich große Frequenzverschiebungen. Der Sensor rechts oben in Abb. 3.16a besitzt keine Masse und dient als Referenz.

### 3.3 Versuche zum Auflösungsvermögen des Sensors

Zusätzlich werden die Sensoren im Durchmesser variiert und die Massensensitivitäten werden miteinander verglichen. Die großen Sensoren mit 96  $\mu\text{m}$  Durchmesser werden auch optisch gemessen und in Kap. 4.2 mit den elektrischen Messungen verglichen.

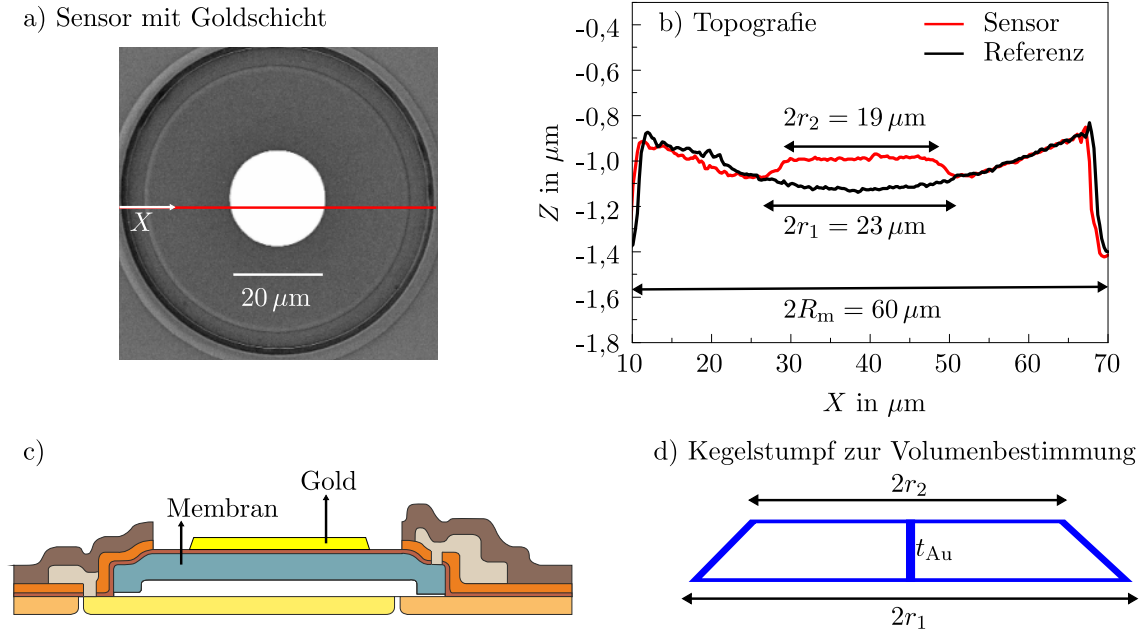


Abbildung 3.17: Charakterisierung des Auflösungsvermögens des Sensors mit dünnen Goldschichten. (a) REM Aufnahme des Sensors, (b) gemessene Topografie, (c) schematische Zeichnung des Sensors mit Goldschicht und (d) Kegelstumpf zur Volumenbestimmung der Goldschicht.

Die Masse  $m_{\text{Au}}$  der Goldschicht wird aus dem Volumen und der Dichte ermittelt. Das Volumen wird bestimmt durch Messen der Topografie (Abb. 3.17).

Die REM Aufnahme zeigt einen Sensor mit 60  $\mu\text{m}$  Durchmesser und einem Goldkreis von 22  $\mu\text{m}$  Durchmesser (Abb. 3.17a). Entlang der roten Linie wird die Profilhöhe mit Weißlicht Interferometrie gemessen (Abb. 3.17b). Der Querschnitt des Sensors ist in Abb. 3.17c schematisch dargestellt.

Wegen der Flanken, die bei der Herstellung der Goldschicht auftreten, wird das Volumen mit einem Kegelstumpf bestimmt. Das Volumen des Kegelstumpfs lautet

$$V_{\text{Au}} = \frac{\pi}{3} h \left( r_1^2 + r_1 r_2 + r_2^2 \right) \quad (3.1)$$

### 3 Experimente

mit dem unteren Radius  $r_1$  und dem oberen Radius  $r_2$  (Abb. 3.17d).

Die Masse  $m_{\text{Au}} = \rho_{\text{Au}} \cdot V_{\text{Au}}$  wird über das Volumen und die Dichte von Gold ermittelt. Die Dichte von Gold beträgt  $19,3 \cdot 10^3 \text{ kg/m}^3$  und die vom Haftlayer Titan  $4,5 \cdot 10^3 \text{ kg/m}^3$  [65]. Das ergibt für das obige Beispiel eine Masse von 670 pg.

In dünnen Goldschichten unter 100 nm steigt die Gitterkonstante mit der Schichtdicke [66]. Die Gruppe von Dr. Švorčík hat die Dichte von gesputterten Goldschichten auf Glassubstraten in [67] theoretisch aus der Gitterkonstanten berechnet und in [68] experimentell nachgewiesen. Die Dichte von Gold sinkt von  $19,3 \cdot 10^3 \text{ kg/m}^3$  bei 80 nm Schichtdicke auf  $18,7 \cdot 10^3 \text{ kg/m}^3$  bei 10 nm [67]. Wegen dieser Abhängigkeit wird für die Dichte eine Messungenauigkeit von  $0,02 \cdot 10^3 \text{ kg/m}^3$  abgeschätzt.

Der Fehleranteil des Volumens ergibt sich aus den Messunsicherheiten des Interferometers. Die Kalibration des Interferometers mit definierten Strukturen in  $x$ - und  $y$ -Richtung und mit Stufenkanten definierter Höhen zwischen 100 nm und 120 nm in  $z$ -Richtung ergeben Messunsicherheiten von  $0,2604 \mu\text{m}$  für die Radien  $r_1$  und  $r_2$  und  $0,025 \mu\text{m}$  für die Höhe  $h$ . Über das Fehlerfortpflanzungsgesetz wird daraus der Fehleranteil der Masse berechnet.

#### Nanopartikel und Mikrokugeln

Die Methoden zur Pipettierung der anorganischen Proben wird nach dem Prinzip durchgeführt, das in Kap. 3.1 beschrieben wurde:

- (a) Resonanzfrequenz messen,
- (b) Adhäsion der Partikel an die Sensoroberfläche,
- (c) Trocknen,
- (d) Resonanzfrequenz erneut messen.

Die Unterschiede sind, dass die Partikel nicht abgespült werden und dass die Tropfen und Partikel auf dem Sensor analysiert werden. Die Schritte zur Durchführung werden entsprechend der Methode angepasst und sind in Abb. 3.18 für das automatische Pipettieren von Nanopartikeln mit dem Dispenser und in Abb. 3.19 für das manuelle Pipettieren von Mikrokugeln beschrieben.

Das Pipettieren erfordert eine Voruntersuchung von Sensor und Tropfen. Am Nanodispenser wird getestet, ob der Tropfen auf dem Sensor platziert wird. Falls der Tropfen neben den Sensor fällt, werden die Parameter angepasst bzw. die Kapillarspitze nochmals gereinigt. Dieser Test wird mit destilliertem Wasser durchgeführt,

### 3.3 Versuche zum Auflösungsvermögen des Sensors

da es rückstandsfrei verdunstet.

Bei der Charakterisierung mit Mikrokugeln werden die Mikrokugeln am Ende gezählt und aus dem Volumen die Masse bestimmt. Dafür werden vor und nach dem Pipettieren Fotos vom Sensor gemacht. Die Frequenzmessung wird gestoppt, die Platine mit dem montierten Sensor entnommen und unter einem Mikroskop platziert. Anschließend wird die Platine wieder in das Messsystem eingesetzt.

Der Wassertropfen mit den Nanopartikeln ist klein genug, um auf den Sensor zu passen. Deshalb ist es möglich, einen weiteren Sensor in unmittelbarer Nähe als Referenz zu verwenden und beide Sensoren gleichzeitig zu messen. Das Pipettieren von Mikrokugeln mit dem Nanodispenser wurde ausprobiert. Die Mikrokugeln sind agglomeriert und haben die Kapillarspitze verstopft. Das Messen mit einem Referenzsensor war also so nicht möglich und wurde deshalb an nur einem Sensor ohne Referenz durchgeführt, auf dem die Mikrokugeln manuell und in größerem Tropfen-

Tabelle 3.4: Vergleich der Untersuchungsmethoden zur Positionierung der Nanopartikel und Mikrokugeln auf dem Sensor.

	Nanopartikel	Mikrokugeln
Methode	automatisch	manuell
Dispenser	Nanodispenser	Eppendorf Pipette
$V_{\text{Tropfen}}$ [nl]	1,8	1000
Adhäsionszeit	bis zur Verdunstung	bis zur Verdunstung
Masse bestimmen	Konzentration	Kugeln zählen
Vorteile	zielgenau	geringer Aufwand
	Tropfenvolumen messen	sichtbar im Mikroskop
	kleine Volumina	individuelles Volumen
	reproduzierbar	Verdünnungen
Nachteile		variable Adhäsionszeit
	teuer	verstopft Kapillare
	hoher Aufwand	Coffee-Ring Effekt
	Agglomeration	keine Reproduktion
	keine Verdünnung	
	Masse grob abzuschätzen	
	keine Zeit für Adhäsion	



### 3 Experimente

volumen pipettiert wurden.

Zuletzt wird wieder ein Frequenzscan vom Sensor durchgeführt. Die Verschiebung der Frequenz  $\Delta f$  zur Eigenfrequenz  $f_0$ , die zu Beginn des Experiments aufgenommen wurde, wird daraus ermittelt.

Tabelle 3.4 fasst die Vor- und Nachteile der beiden Untersuchungsmethoden zusammen. Das Positionieren mit dem Nanodispenser hat zwar den Vorteil, dass der Sensor zielgenau getroffen wird, aber es ist wesentlich aufwändiger als die Partikel manuell zu pipettieren. Die Adhäsion von Biomolekülen an eine biochemisch beschichtete Oberfläche erfordert Adhäsionszeit, die am Nanodispenser nicht gegeben ist, da der

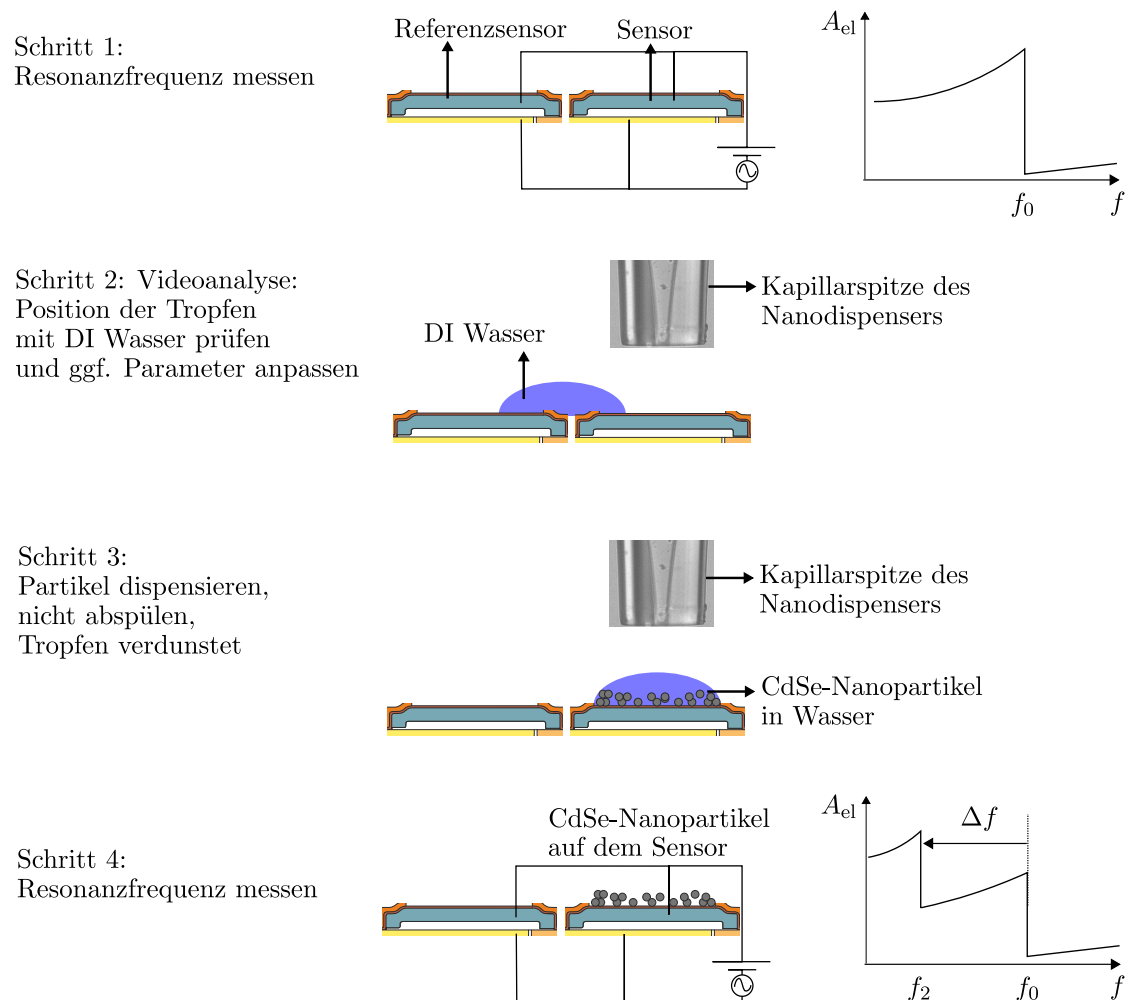
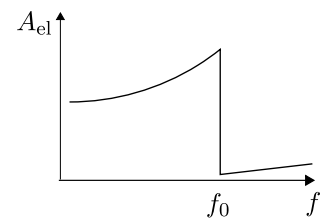
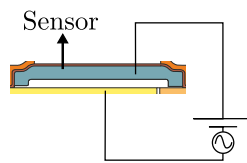


Abbildung 3.18: Charakterisierung des Sensors mit Nanopartikeln am Nanodispenser.

### 3.3 Versuche zum Auflösungsvermögen des Sensors

Tropfen in wenigen Sekunden trocknet. Dies und der deutlich geringere Aufwand lassen die Wahl auf das manuelle Pipettieren fallen.

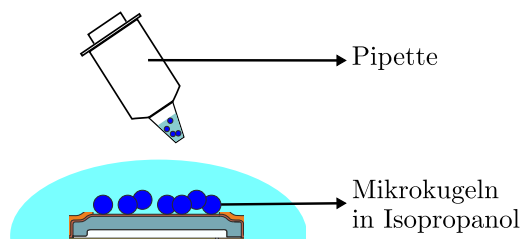
Schritt 1:  
Resonanzfrequenz messen



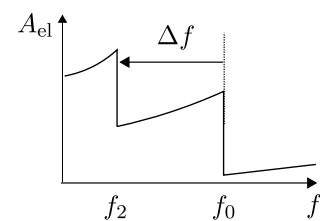
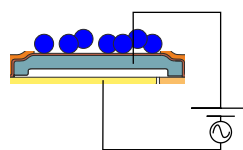
Schritt 2: Fotoanalyse:  
Messung stoppen,  
Sensor im Mikroskop prüfen



Schritt 3:  
Partikel pipettieren;  
Tropfen verdunstet



Schritt 4:  
Resonanzfrequenz messen



Schritt 5:  
Mikrokugeln zählen



Abbildung 3.19: Charakterisierung des Sensors mit Mikrokugeln.

## 3.4 Versuche zur Selektivität des Sensors

Dieses Kapitel beschreibt die Versuchsdurchführung zur Bestimmung der Selektivität des Sensors. Die Sensoroberfläche wird biochemisch funktionalisiert, sodass, wie in Kap. 2.3 beschrieben, die Biomoleküle haften bleiben. Im Experiment werden Biomoleküle auf die Sensoren aufgebracht, die aufgrund ihrer Masse eine Frequenzverschiebung bewirken, wie anhand von Abb. 3.3 in Kap. 3.1 beschrieben.

Aufgrund der starken spezifischen Bindung an Biotin und einer, im Vergleich zu Allergenen, großen Masse wird die Sensitivität des Sensors mit dem Protein Streptavidin untersucht. Im Anschluss wird die biologische Anwendung mit Biomarkern gezeigt.

Die Präparation der organischen Proben und die Durchführung der Experimente werden im Folgenden beschrieben. Die theoretischen Eigenschaften der Biomoleküle und deren spezifische Bindung an die biochemische Oberfläche des Sensors sind in Kap. 2.3 erklärt. Die Ergebnisse werden in Kap. 4.3 erläutert.

### 3.4.1 Präparation organischer Proben

Die organischen Proben bestehen aus Pufferlösungen mit Biomolekülen. Die Biomoleküle in dieser Arbeit sind eine Auswahl an Proteinen, die kommerziell erhältlich sind oder von den Projektpartnern zur Verfügung gestellt wurden. Diese binden sich an die funktionalisierte Oberfläche des Sensors. Das Verdünnen und das Pipettieren der organischen Proben auf den Sensor wird hier erläutert.

#### Pufferlösung

Die Pufferlösung besteht aus einer Tablette PBS, die in DI Wasser gelöst wird. Das PBS wird von der Firma Life Technologies bezogen. Eine Tablette PBS enthält 10 mM Phosphat, 2,68 mM Kaliumchlorid und 140 mM Natriumchlorid. Eine Tablette PBS wird in 500 ml DI Wasser 20 min im Ultraschallbad aufgelöst. Diese Pufferlösung mit einem pH-Wert von 7,45 wird sowohl zum Spülen als auch zum Verdünnen verwendet. Das Verdünnen der Biomoleküle findet in Pufferlösungen mit zugesetzten Detergenzien statt, um Agglomerationen zu verhindern. Hier wird das Tensid Tween® 20, Polyethylene glycol sorbitan monolaurate (Tween20) zu 0,05 % hinzugefügt.

#### Biomoleküle

Die Proteine Streptavidin und BSA werden von der Firma Life Technologies bezogen. Sie sind fluoreszenzmarkiert mit Alexa Fluor® 488 (AF488) bzw. Alexa Fluor®

647 (AF647). In 1 mg Streptavidin und in 5 mg BSA wird jeweils 1 ml Pufferlösung pipettiert, sodass die Stammlösungen eine Konzentration von 1 mg/ml Streptavidin AF488 und 5 mg/ml BSA AF488 bzw. AF647 haben. Die Stammlösungen mit 1 mg Streptavidin bzw. 5 mg BSA werden mit derselben Pufferlösung nochmals verdünnt, um Konzentrationen im Bereich von 20 µg/ml bis 1000 µg/ml für das Experiment zu erhalten.

Der Analyt ctxB wird von der Firma Sigma Aldrich in einer wässrigen Lösung bezogen und er ist fluoreszenzmarkiert mit AF647. Die Stammlösung von 100 µg/ml wird mit 400 ml Pufferlösung verdünnt. Die Konzentration der Probe ist dementsprechend 20 µg/ml ctxB in Pufferlösung.

Der IgG Antikörper Rabbit Anti-G<sub>M1</sub> wird von der Firma Calbiochem ebenfalls in einer wässrigen Lösung bezogen. Die Stammlösung von 100 ml wird mit 400 ml Pufferlösung verdünnt, wobei die Pufferlösung 0,1 % BSA statt des Tensids Tween20 gegen die Agglomeration des Antikörpers enthält.

#### Spülen

Die Sensorchips werden mit der Pufferlösung PBS und DI Wasser gespült. Dazu werden die Sensorchips mit einer Pinzette in ein Becherglas mit PBS gelegt. Nach dem Bad werden sie 20 s mit PBS abgespült. Dies wird mit einem Wasserbad wiederholt.

Anschließend werden die Sensoren 30 s unter Stickstofffluss getrocknet, da die Messungen im Trockenen stattfinden.

#### Pipettieren

Für die Adhäsion der Biomoleküle auf dem Sensor werden die Sensorchips in 200 µl der Probe eingetaucht. Während der Adhäsion wird die Probe bei 150 U/min auf einer Vibrationsplatte in Bewegung gehalten.

Anschließend wird der Sensorchip mit einer Pinzette aus dem Reaktionsgefäß entnommen, gespült und getrocknet.

### 3.4.2 Charakterisierung

In diesem Kapitel wird das Experiment mit Biomarkern ctxB und Anti-G<sub>M1</sub> beschrieben. Die Sensoroberfläche wurde von der Universität Wageningen mit dem Zucker G<sub>M1</sub> funktionalisiert, wie in Kap. 2.3.3 beschrieben. Die Messungen finden im Trockenen statt, d.h. vor den elektrischen Messungen werden die Sensoren in PBS

### 3 Experimente

und ultrareines Wasser getaucht, mit der jeweiligen Lösung abgespült und anschließend unter Stickstofffluss getrocknet. Der Sensorchip wird vollständig in die Pufferlösung eingetaucht und auf einer Vibrationsplatte langsam gerührt, damit sich der Analyt an die funktionalisierte Sensoroberfläche bindet.

Zu Beginn des Experiments wird jeder Sensorchip 15 min bei 150 U/min in die Pufferlösung PBS mit 0,1 % BSA und 0,05 % Tween20 ohne Analyten getaucht, anschließend gereinigt, getrocknet und elektrisch kontaktiert.

Nach Anlegen der Gleich- und Wechselspannung wird die Frequenz der angelegten Wechselspannung in 50 Hz Schritten gescannt. Die gemessenen Resonanzfrequenzen ergeben die Basislinie des  $G_{M1}$  beschichteten Sensors.

Im Anschluss an die elektrische Messung werden die Spannungen auf Null gesetzt und der Sensorchip in 200  $\mu$ l der Pufferlösung mit 0,2 mg/ml ctxB eingetaucht. Nach 15 min bei 150 U/min wird der Sensor gereinigt, getrocknet und wieder elektrisch kontaktiert. Die gemessenen Resonanzfrequenzen ergeben die Linie des  $G_{M1}$  beschichteten Sensors mit gebundenem ctxB. Untersucht wird die Verschiebung der Resonanzfrequenz zur Basislinie aufgrund von zusätzlicher Masse des gebundenen ctxB.

Der Nachweis der spezifischen Bindung erfolgt durch negative Proben und durch Fluoreszenzspektroskopie, deshalb sind ctxB und das Protein BSA mit Alexa Fluor 647 markiert. Für die negativen Proben unter Verwendung eines anderen Analyten werden die  $G_{M1}$  funktionalisierten Sensorchips in Pufferlösung mit 1 % BSA und 0,05 % Tween20 statt des ctxB getaucht. Für die negativen Proben des ctxB auf anderen Oberflächen werden ein biotinylierter Sensor und ein blanker, nicht funktionalisierter Siliziumnitrid-Sensor verwendet.

Jeder Sensorchip wird nur ein Mal verwendet. Die Reproduktion und die negativen Proben finden also auf unterschiedlichen Sensorchips statt, die dasselbe Sensorlayout besitzen. Die Basislinie wird dementsprechend für jeden Sensor neu vermessen.

Das Experiment mit dem Antikörper Anti- $G_{M1}$  wird ähnlich durchgeführt. Da sich der Antikörper an BSA bindet und dadurch blockiert werden kann, wird auf BSA in den Pufferlösungen verzichtet.

Der Antikörper Anti- $G_{M1}$  ist nicht fluoreszierend. Aus diesem Grund wird für den Nachweis mit Fluoreszenzspektroskopie  $G_{M1}$  verwendet. Das Experiment hat entsprechend einen Schritt mehr, bei dem sich fluoreszierende  $G_{M1}$  an das Anti- $G_{M1}$  binden, das wiederum an dem  $G_{M1}$  auf dem Sensor bindet.

### 3.5 Integration des Sensorprinzips

In diesem Kapitel werden die Integrationen der CMOS-ROIC, der Mikrofluidik und der Fluidik erklärt. Eines der Ziele dieser Arbeit ist, das Messsystem zu entwickeln und zu miniaturisieren, wie in Kap. 3.1 beschrieben ist. Dies wird durch Integrationen der Ausleseschaltung und der Mikrofluidik auf den Sensorchip untersucht.

#### 3.5.1 CMOS-integrierte Ausleseschaltung

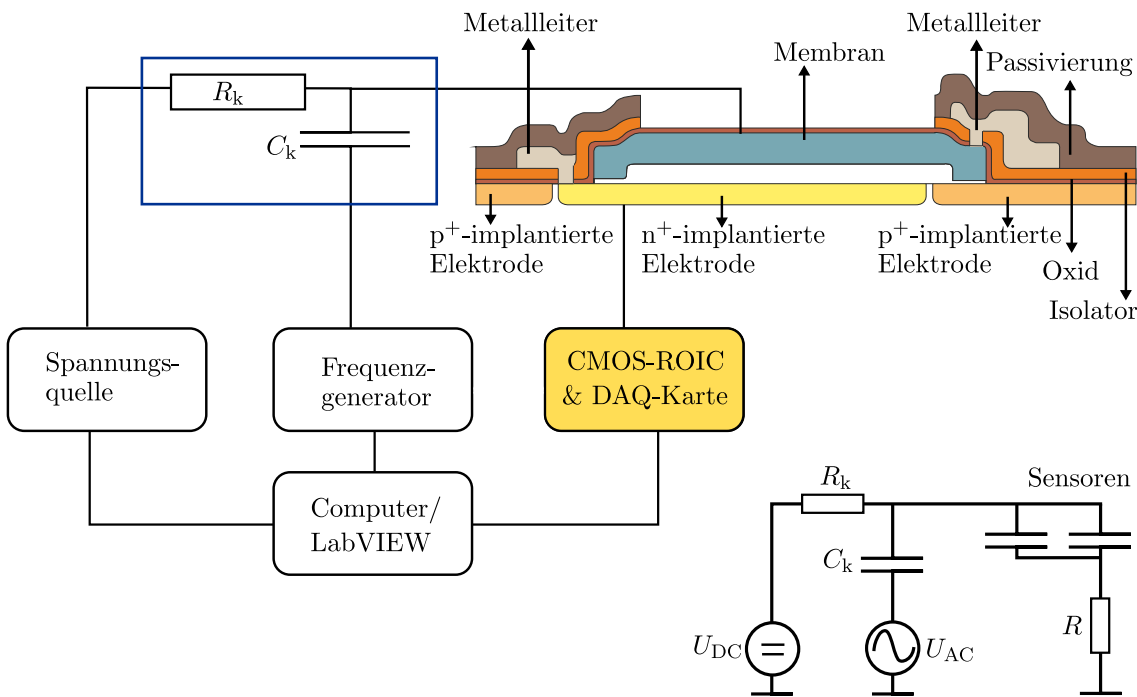


Abbildung 3.20: Schematische Zeichnungen des Experiment Setups mit CMOS-integrierter Ausleseschaltung (ROIC) und des Schaltplans.

Abb. 3.20 zeigt das Messsystem, in dem der Lock-In Verstärker aus Abb. 3.8 durch eine CMOS-ROIC ersetzt wird. Im Vergleich zum diskreten Sensor sind hier die Ausleseschaltung und ein weiterer Sensor auf dem Sensorchip integriert. Die Spannungsquelle und der Frequenzgenerator bleiben dieselben.

Die ROIC ermöglicht eine Signalverarbeitung direkt auf dem Sensorchip. Der Verzicht auf Kabel erhöht die Performance, sodass das Signal schneller verarbeitet wird und parasitäre Einflüsse reduziert werden.

Im CMOS-Prozess werden ROIC und MEMS-Sensor gleichzeitig hergestellt. Die Miniaturisierung der Ausleseschaltung auf die Größe des Sensorchips ist deshalb

### 3 Experimente

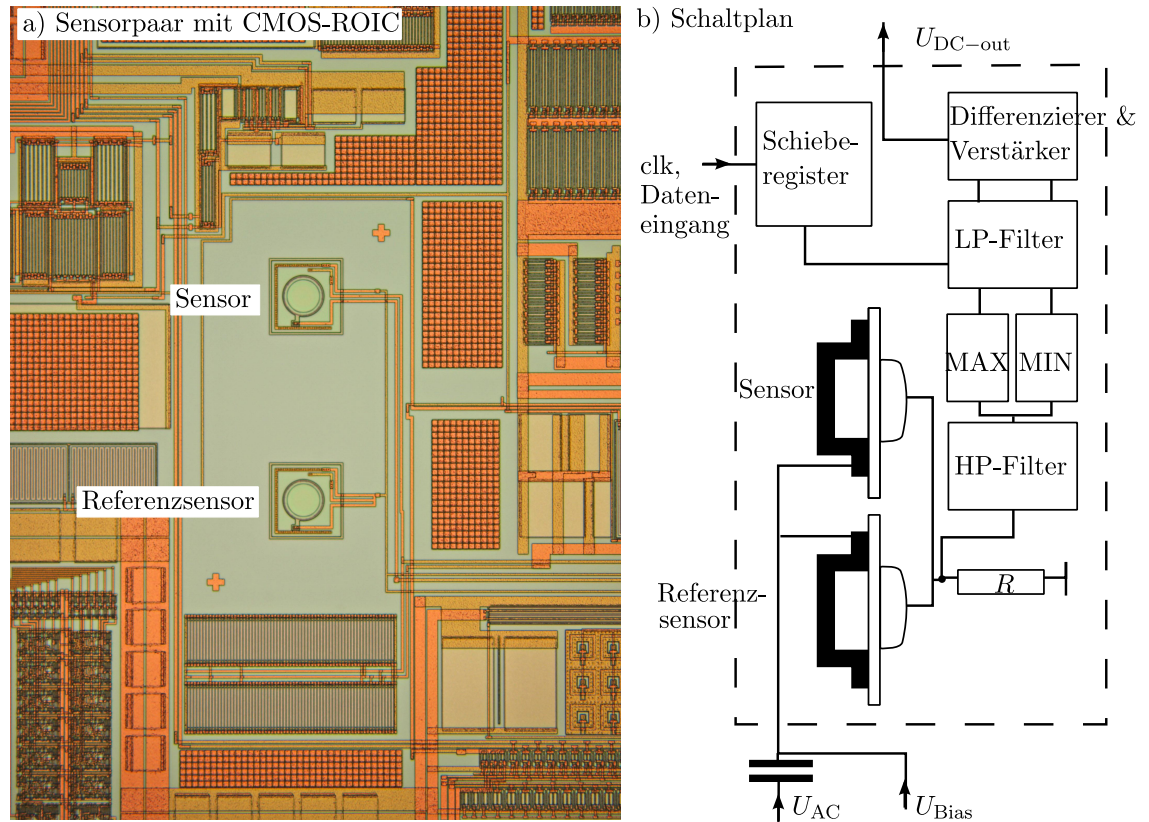


Abbildung 3.21: Sensor mit CMOS-integrierter Ausleseschaltung (ROIC), nach [19]. (a) Lichtmikroskopaufnahme. (b) Schematische Zeichnung der Ausleseschaltung.

kostengünstiger und eines der Ziele dieser Arbeit.

Abb. 3.21a zeigt ein Foto des Sensorchips mit einem Sensorpaar in der Mitte und der ROIC. Die Sensoren mit ROIC gibt es in zwei Größen:  $60\ \mu\text{m}$  und  $96\ \mu\text{m}$  Durchmesser.

Sensor und Referenz können getrennt angesteuert werden, aber das zu messende Signal wird gemeinsam verarbeitet. Dies ermöglicht das Anpassen der Resonanzfrequenzen durch den Spring-Softening Effekt, indem unterschiedliche Biasspannungen  $U_{Bias}$  angelegt werden (vgl. Kap. 3.2).

Die Schaltung der ROIC ist zur Signalverarbeitung in Abb. 3.21b schematisch dargestellt. Sowohl Sensor als auch Referenzsensor werden von einer sinusförmigen Spannung zur Oszillation angeregt. Die Spannung wird von der ROIC auf dem Sensorchip verarbeitet und als Gleichspannung  $U_{DC-out}$  ausgegeben. Dafür wird das Signal von einem Hochpass (HP) gefiltert. Die Spitze-Tal-Werte (MAX und MIN) der sinusförmigen Spannung werden von einem Tiefpass (LP) gefiltert und anschließend diffe-

renziert und verstärkt. Dabei werden die Bauteile über ein 16 Bit Schieberegister versorgt und programmiert.

Die Ausgangsspannung  $U_{\text{DC-out}}$  wird von einer Datenerfassungskarte (DAQ-Karte) analog-digital umgewandelt. Ein selbst entwickeltes LabVIEW Programm steuert das gesamte Messsystem, indem die Frequenz der Anregungsspannung  $U_{\text{AC}}$  gescannt und die Amplitude der Ausgangsspannung  $U_{\text{DC-out}}$  gemessen werden. Das Programm gibt dabei die Frequenz der Anregungsspannung vor und weist dem Messpunkt die Frequenz zu.

Erste Messergebnisse von Sensoren mit CMOS-ROIC werden in Kap. 4.4 erläutert.

#### 3.5.2 Integration einer Mikrofluidik

Das Arbeiten mit Flüssigkeiten auf dem Sensorchip soll mit integrierter Mikrofluidik auf dem Mikrosystem erleichtert und für die biochemische Analyse verwendet werden. Das Interesse ist so groß, dass in kürzester Zeit ein interdisziplinärer Forschungsbereich entstanden ist, der die Natur-, Material- und Ingenieurwissenschaften vereint. Vollständige Mikrosysteme zur Analyse, auch genannt „Lab on a chip“, sind durch die Verwendung von Pumpen, Elektroden und Detektoren entstanden [69]. Das Thema ist jedoch zu komplex, als dass in dieser Arbeit im Detail darauf eingegangen werden kann.

Die Integration der Mikrofluidik in das Messsystem hat neben den physikalischen Vorzügen im Mikrometerbereich einige anwendungsspezifische Vorteile. Das Messsystem wird miniaturisiert, wodurch das Probenvolumen auf den Nanoliterbereich reduziert wird. Dadurch ist das System handlicher gebaut und einfacher zu bedienen. Die Kontamination durch Partikel und andere Proben wird reduziert.

##### Prinzip der Mikrofluidik

Das Prinzip der Mikrofluidik auf dem Sensor ist in Abb. 3.22 dargestellt. Der Tropfen der Probe wird mit Kapillarkräften über den Sensor gezogen. Tropfen auf dem Sensor beeinflussen die Performance und müssen vermieden werden. Aufgrund der Dämpfung durch die Flüssigkeit ist es erforderlich, dass die Messung im Trockenen durchgeführt wird. Der Tropfen muss also vollständig über den Sensor gezogen werden.

Wie in Abb. 3.22 dargestellt, besteht eine Messreihe aus: Resonanzfrequenz messen, Adhäsion der Biomoleküle, Spülen und anschließend Resonanzfrequenz erneut messen. Die Adhäsionszeit muss groß genug sein, sodass sich das Biomolekül an der



### 3 Experimente

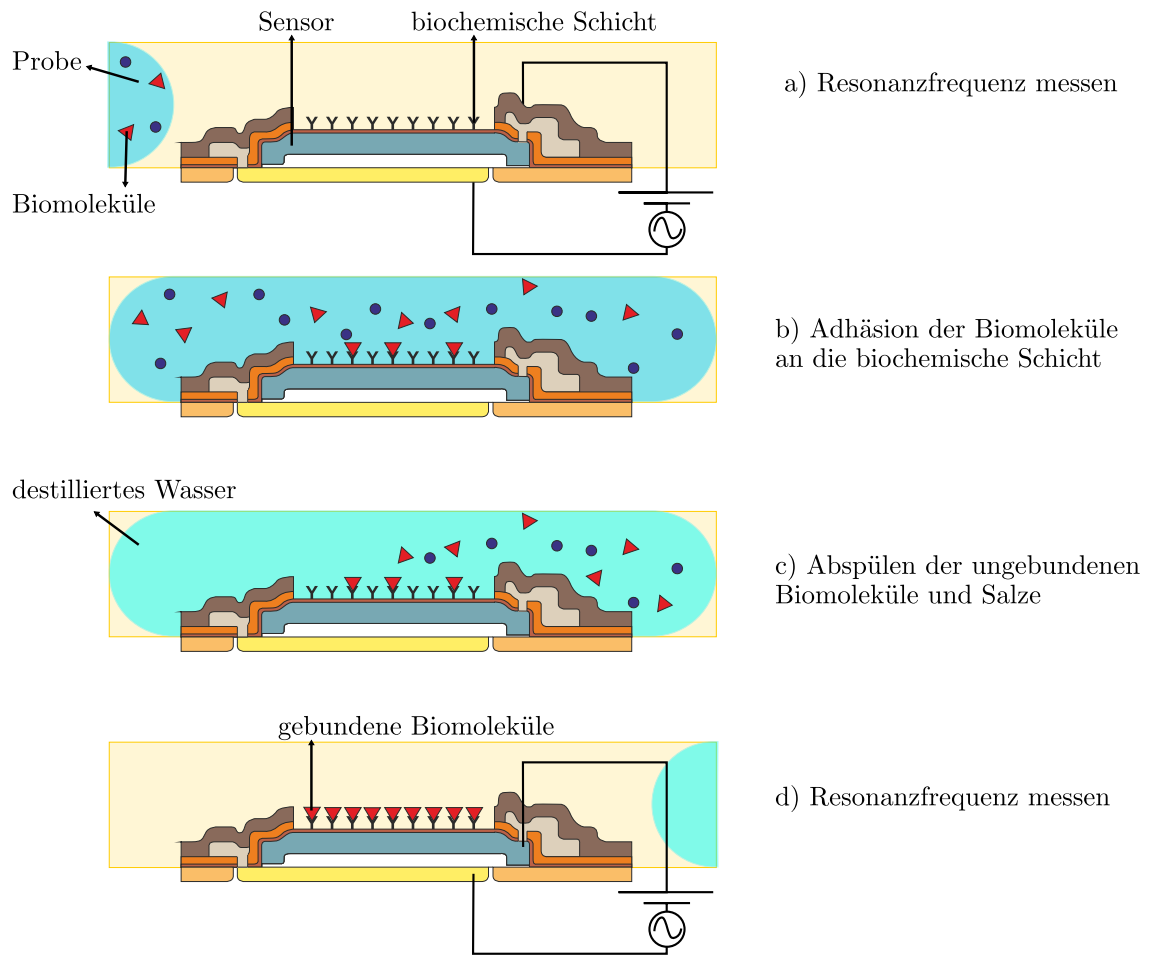


Abbildung 3.22: Funktionsprinzip des Experiments mit der Mikrofluidik auf dem Sensor.

biochemischen Schicht absetzen kann. Das Spülen soll die nicht gebundenen Biomoleküle und die Salze fortspülen.

#### Erster Prototyp mit Kapillarpumpe

Das Layout des Prototyps ist in Abb. 3.23 dargestellt. Der Reaktionskanal ist 100  $\mu\text{m}$  breit, also etwas größer als der Sensor. Der Kanal wird auf einem Sensor positioniert, während der Referenzsensor frei bleibt. Die Probe wird über eine Öffnung eingefüllt und durch den Reaktionskanal über den Sensor geführt. Eine Mäanderstruktur hält den Fließwiderstand gleichmäßig. Kapillarkräfte zwischen den Mikrostrukturen der Kapillarpumpe ziehen die Probe durch die Mikrofluidik [70]. Die Luft weicht durch die Öffnungen am Ende aus.

### 3.5 Integration des Sensorprinzips

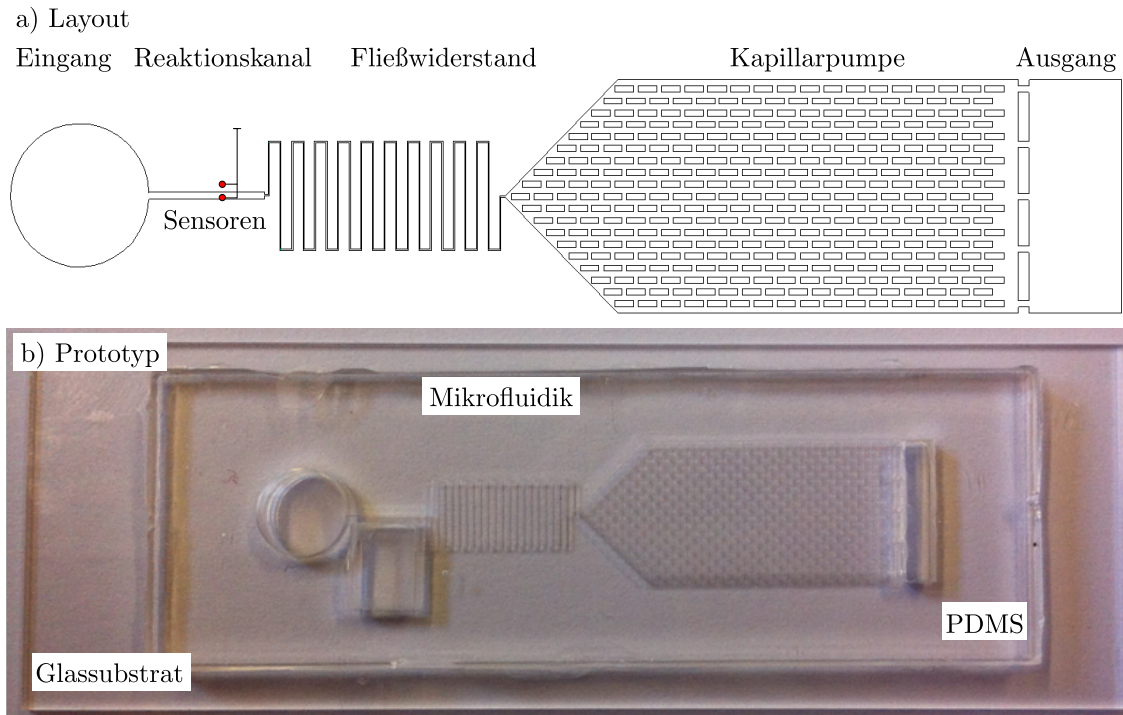


Abbildung 3.23: Layout des Mikrofluidik Prototyps.

Das Layout der Kapillarpumpe ist nach einer FEM mit der Simulationssoftware COMSOL entwickelt worden.

Das Layout der Mikrofluidik ist selbst entwickelt. Ein Negativ und der Prototyp wurden von der Firma GeSim gebaut. Der Prototyp in Abb. 3.23 besteht aus Polydimethylsiloxan (PDMS), einem Polymer auf Siliziumbasis. Der Prototyp ist auf einem Glassubstrat gebondet. Für das Bonden der Mikrofluidik auf das Substrat werden beide Oberflächen mit Sauerstoff-Plasma behandelt. Ein gleichmäßiger Druck von 10 Nm versiegelt beides.

Erste Tests mit dem Prototyp zeigen, dass die Mikrofluidik bis zum Eintritt der Probe in die Kapillarpumpe funktioniert. In Kap. 4.4 werden die Ergebnisse erläutert.

#### Zweiter Prototyp mit Spritzen

Gemeinsam mit der Radboud Universität Nijmegen wird das Layout der Mikrofluidik weiter entwickelt. Es wird ein System entwickelt, das aus einer einfachen Mikrofluidik, zwei Spritzen und zwei Syringe-Pumpen besteht.

Die Mikrofluidik ist ein Kanal mit zwei Öffnungen am Ende. An die Öffnungen werden Spritzen über dünne Schläuche angeschlossen. Die Spritzen haben den Vorteil,

### 3 Experimente

dass beliebige Flüssigkeiten in beliebigen Mengen getestet werden können.

Die Spritzen werden auf Syringe-Pumpen gespannt. Die Syringe-Pumpen können sowohl manuell als auch über ein selbstprogrammiertes LabVIEW Programm bedient werden. Die Probe kann sowohl durch den Kanal gezogen als auch gepumpt werden.

#### **Dritter Prototyp mit Kapillarpumpe**

Desweiteren wird das Layout des Prototyps an das Adaptersystem angepasst. Die Platine wird weiter entwickelt, sodass die Mikrofluidik vollständig darauf passt.

Der Sensorchip wird auf die Platine und darauf wird die Mikrofluidik montiert. Die gesamte Mikrofluidik erfordert eine glatte Oberfläche ohne Höhendifferenzen. Jedoch haben Sensorchip und Platine einen Höhenunterschied von  $800\text{ }\mu\text{m}$ , weshalb die Platine mit PDMS aufgefüllt wird.

Zum Auffüllen wird ein Positiv der Platine mit montiertem Sensorchip erstellt. Darauf wird ein Deckel gesetzt, der auf  $100\text{ }\mu\text{m}$  genau die Höhe zum Sensorchip ausgleicht. Das PDMS wird darin eingefüllt und ausgehärtet. Im Anschluss wird dieser PDMS Block auf die Platine gesetzt und darauf wird die Mikrofluidik montiert.

Durch die gezielte Führung der Flüssigkeiten durch die Mikrofluidik wird vermieden, dass diese an die Bonddrähte gelangt und dort Kurzschlüsse verursacht. Deshalb ist eine komplette Versiegelung mit Globtop nicht nötig. Nur die Bondfüße werden mit Silikon Globtop geschützt. Dies ermöglicht mehr Platz und entsprechend mehr Haftung für die Mikrofluidik auf dem Sensorchip.

Erste Haftungstests wurden an der Radboud Universität Nijmegen erfolgreich auf der Platine ohne Sensorchip durchgeführt. Weitere Haftungstests stehen noch aus. Währenddessen wurde ein Messsystem mit programmierbarer Fluidik entwickelt. Die Fluidik ist eine Art selbstgebauter Dispenser, der mit Syringe-Pumpen Flüssigkeiten im Mikroliterbereich über den Sensorchip fließen lässt. Das Messsystem wird im folgenden Kapitel erläutert.

#### **3.5.3 Integration einer programmierbaren Fluidik**

Ein automatisches Messsystem mit programmierbarer Fluidik wurde entwickelt. Das Messsystem detektiert die Resonanzfrequenzen vollautomatisch und führt die nötigen Sequenzen für die Detektion von Biomolekülen bzw. Partikeln durch. Über ein selbstprogrammiertes LabVIEW Programm sind sowohl die Messreihe als auch das Arbeiten mit den Flüssigkeiten vollautomatisch und kontrollierbar. Damit können

drei Flüssigkeiten individuell und kontrolliert über den Sensor gepumpt werden. Zusätzlich wird der Sensorchip über Stickstofffluss getrocknet, sodass die Messung im Trockenen stattfindet.

#### Aufbau

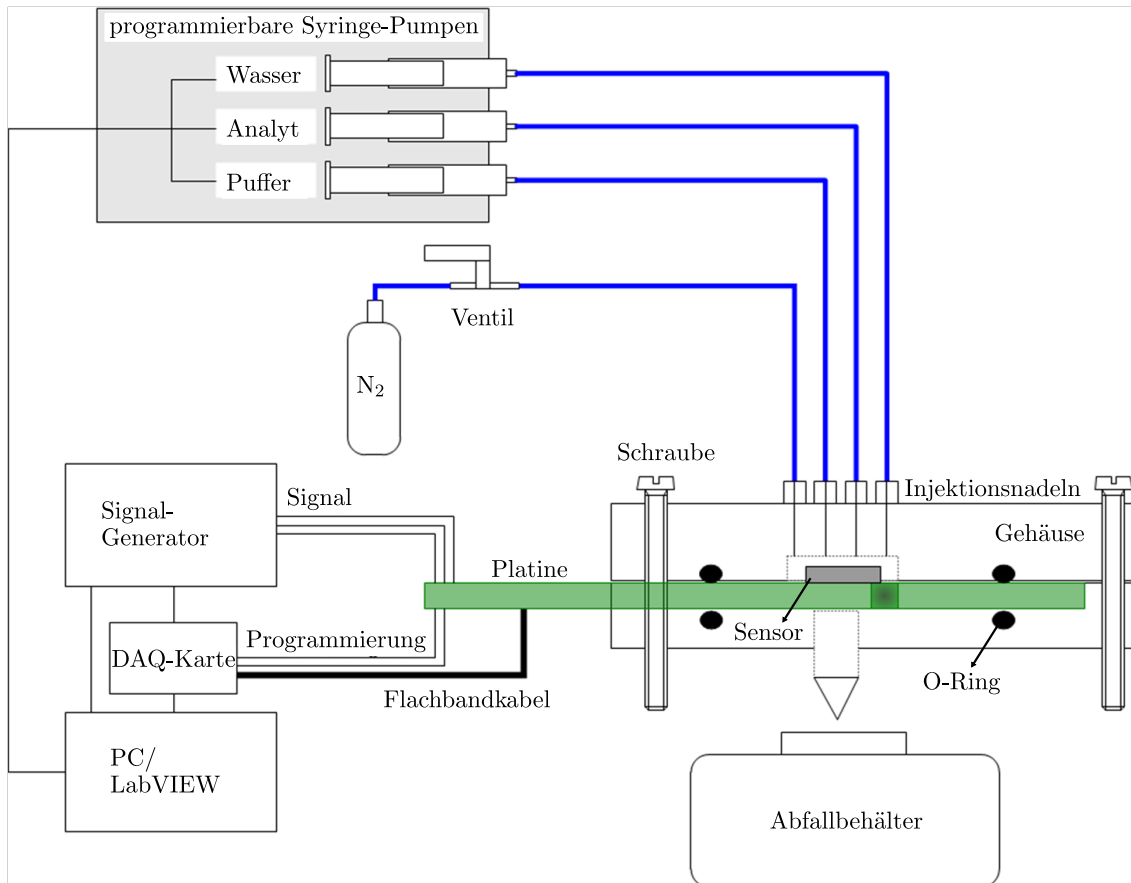


Abbildung 3.24: Layout der programmierbaren Fluidik.

In Abb. 3.24 ist der Aufbau des Messsystems mit programmierbarer Fluidik schematisch dargestellt.

Die Mikrofluidik wird durch ein chemiebeständiges Teflongehäuse ersetzt. Das Gehäuse umschließt Platine (grün) und Sensorchip (grau), für die im Gehäuse Aussparungen gelassen sind. Die Flüssigkeit wird oben durch Injektionsnadeln eingefüllt, fließt um den Sensorchip herum und durch ein Loch der Platine in eine Glasflasche. O-Ringe aus relativ chemiebeständigem Viton<sup>®</sup> dichten das Teflongehäuse ab, sobald es zugeschraubt wird. Das verhindert das Austreten der Flüssigkeit zu den

### 3 Experimente

elektrischen Anschlüssen.

Die Chemiebeständigkeit der Viton<sup>®</sup> O-Ringe wurde getestet. Nach ein paar Stunden in den verwendeten Flüssigkeiten wurden keine Veränderungen der Flüssigkeit oder O-Ringe entdeckt. Die Flüssigkeit hat sich weder verfärbt noch waren die O-Ringe eingerissen. Es bleiben also keine Rückstände der O-Ringe versehentlich auf dem Sensor. Die Ringe sind nur leicht größer geworden, da Viton<sup>®</sup> Wasser aufnimmt. Dies beeinflusst jedoch nicht das Abdichten des Teflongehäuses. Die Bonddrähte und die elektrischen Kontakte werden mit Silikon Globtop geschützt.

Der mechanische Stress, der beim Zusammenschrauben des Teflongehäuses entsteht, wurde getestet. Ein Druck von 10 Nm auf die Platine beeinflusst die Resonanzfrequenz nicht. Jedoch wird die Messung erheblich gestört, wenn Druck auf den Globtop aufgebaut wird. Tests ergaben, dass die Bonddrähte reißen, sobald der Globtop berührt wird. Dies gilt sowohl für weichen Silikon- als auch für harten Epoxidkleber als Globtop.

Die Elektronik in Abb. 3.24 ist die Anrege- und Ausleseelektronik des CMOS-integrierten Sensors. Die elektrischen Kontakte der Platine sind außerhalb des Teflongehäuses. Die Platine wird auf dem Adapterboard befestigt. Der Computer steuert über LabVIEW die Messung und detektiert die Resonanzfrequenz automatisch. Die Fluidik wird ebenfalls über das Computerprogramm gesteuert, indem drei Syringe-Pumpen und ein Magnetventil kontrolliert werden. Das Magnetventil öffnet und schließt den Zugang zur Stickstoffkanne, um den Sensor nach dem Spülen zu trocknen. Auf die Syringe-Pumpen werden drei Spritzen mit unterschiedlichen Flüssigkeiten befestigt. Die Geschwindigkeiten, die Richtung und das Probenvolumen der Flüssigkeiten können über die Syringe-Pumpen eingestellt werden.

Die Spritzen haben einen Luer Lock Anschluss, an dem die Schläuche angeschraubt werden. Das verringert das Risiko eines versehentlichen LöSENS der Schläuche. Die Nadeln sind Teil von Infusionsbestecken. Spritzen und Infusionsbesteck sind über sogenannte Heidelberger Verlängerung verbunden. So wird Platz gespart und die Syringe-Pumpen können gegebenenfalls an einer anderen Stelle untergebracht werden.

Im Gegensatz zur Mikrofluidik kann das Teflongehäuse wiederverwendet werden. Das Teflongehäuse wird einfach aufgeschraubt und die Platine mit dem montierten Sensorchip ausgetauscht.

Damit ist ein vollautomatisches Messsystem mit programmierbarer Fluidik gebaut,

### *3.5 Integration des Sensorprinzips*

das auch schon zur Demonstration auf der Messe Sensor und Test 2013 in Nürnberg verwendet wurde. Die Elektronik kann individuell angepasst und miniaturisiert werden. Mit dem System können individuelle Flüssigkeiten auf den Sensor aufgetragen und abgespült werden. Erste Ergebnisse mit diesem System werden in Kap. 4.4 erläutert.

## 4 Ergebnisse

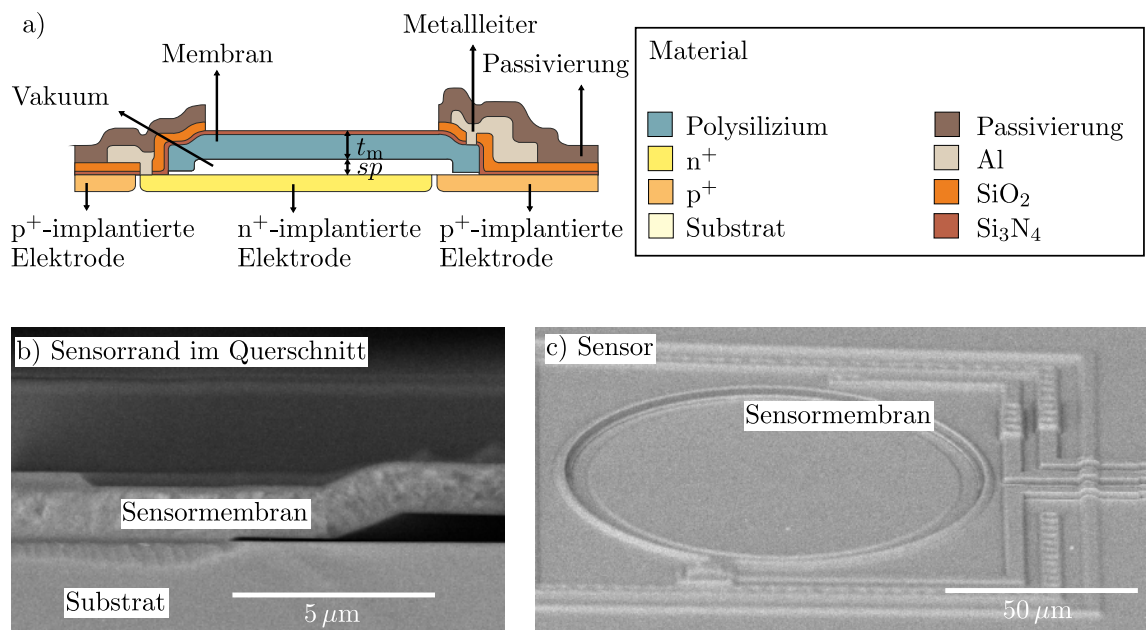


Abbildung 4.1: (a) Schematische Darstellung des Sensors im Querschnitt. (b)-(c) REM Aufnahmen eines Sensors mit 96 µm Durchmesser. (b) Sensorrand im Querschnitt. (c) Sicht auf den Sensor.

Der Sensor ist in Abb. 4.1 dargestellt. Die schematische Darstellung in Abb. 4.1a zeigt den Sensor im Querschnitt. Abbildung 4.1b und Abb. 4.1c zeigen REM Aufnahmen eines Sensors mit 96 µm Durchmesser. Die Aufnahmen zeigen einen Querschnitt am Rand des Sensors (Abb. 4.1b) und den Sensor aus der Vogelperspek-

tive (Abb. 4.1c). Der Aufbau des Sensors ist in Kap. 3 im Detail erklärt.

Die Membran ist  $1,25\text{ }\mu\text{m}$  dick und hat einen Durchmesser von  $60\text{ }\mu\text{m}$ ,  $70\text{ }\mu\text{m}$  bzw.  $96\text{ }\mu\text{m}$ . Der Spacer, also der Abstand zwischen Membran und Substrat, ist  $700\text{ nm}$  groß.

In Kap. 4.1 wird die Resonanz des Sensors charakterisiert. Dafür wird der Sensor elektrostatisch zur Resonanz angeregt und die Frequenz gescannt. Die Amplitude wird elektrisch mit einem Lock-In Verstärker gemessen. Zusätzlich wird die Amplitude optisch mit einem Laserinterferometer gemessen und mit der elektrisch gemessenen Amplitude verglichen.

Die Resonanzfrequenzen der Sensoren werden aus den Frequenzscans ermittelt. In Kap. 4.2 und Kap. 4.3 wird auf die Sensoren Masse hinzugefügt und die Frequenzverschiebung gemessen. Aus der Frequenzverschiebung wird die Massensensitivität des Sensors ermittelt. Die Resonanzfrequenzen und die Massensensitivitäten werden mit Simulationen verglichen.

In Kap. 4.4 werden erste Ergebnisse über die Integrationen der ROIC, der Mikrofluidik und der programmierbaren Fluidik in das System erläutert.

## 4.1 Charakterisierung des Resonanzverhaltens

### 4.1.1 Vergleich elektrischer zu optischer Messmethode

Zunächst werden Messungen der elektrischen Amplitude gezeigt, die bei unterschiedlichen Spannungen durchgeführt werden. Der Sensor hat einen Durchmesser von  $96\text{ }\mu\text{m}$ . Der Sensor wird mit Spannungen von  $U_{\text{DC},1} = 2\text{ V}$  bzw.  $U_{\text{DC},2} = 6\text{ V}$  und einer Wechselspannung von  $U_{\text{AC}} = 2\text{ V}$  ausgelenkt. Die Frequenz der Wechselspannung wird von  $2,50\text{ MHz}$  bis  $2,80\text{ MHz}$  gefahren.

Die elektrischen Amplituden werden mit dem Lock-In Verstärker bei einer Sensitivität von  $1\text{ mV}$  und einer Zeitkonstante von  $1\text{ ms}$  gemessen. Die elektrischen Amplituden sind in Abb. 4.2a und Abb. 4.2b dargestellt. Im Vergleich dazu sind die optisch gemessenen Amplituden der Auslenkung in Abb. 4.2c und Abb. 4.2d aufgetragen. Dabei wird eine maximale Auslenkung von  $80\text{ nm}$  gemessen.

Die elektrischen Amplituden unterscheiden sich in ihrer Verlaufsform. Bei kleiner Biasspannung von  $U_{\text{DC},1} = 2\text{ V}$  in Abb. 4.2a zeigt die elektrische Amplitude das Signal eines harmonischen Oszillators. Die Form der Amplitude wird durch das BvD Modell beschrieben, siehe Kap. 2.2.



#### 4 Ergebnisse

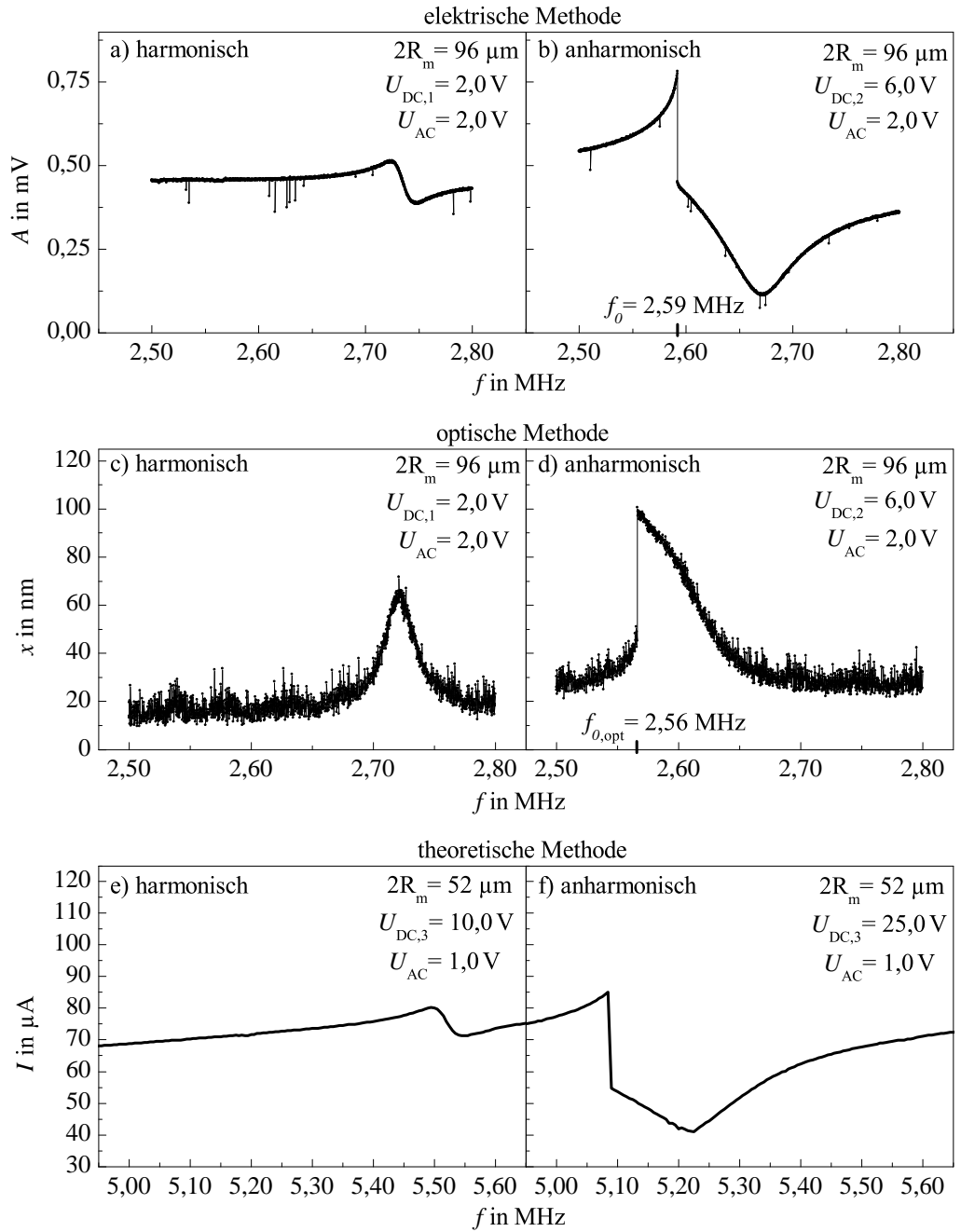


Abbildung 4.2: Frequenzscans für den Vergleich der Untersuchungsmethoden: (a)-(b) elektrische und (c)-(d) optische Frequenzscans eines Sensors mit  $96 \mu\text{m}$  Durchmesser. (e)-(f) Numerische Simulationen eines Sensors mit  $52 \mu\text{m}$  Durchmesser, nach [13]. Vergleich der harmonischen Oszillation (links) zur anharmonischen Oszillation (rechts).

#### 4.1 Charakterisierung des Resonanzverhaltens

Bei großer Biasspannung von  $U_{DC,2} = 6V$  in Abb. 4.2b zeigen die Amplituden dagegen das Signal eines anharmonischen Oszillators. An der Stelle des Maximums steigt die elektrische Amplitude schneller und größer an, bis sie schlagartig bei  $f_0 = 2,59\text{ MHz}$  abfällt. Anschließend nimmt die Amplitude die Form einer harmonischen Kurve an.

Die optische Messung der harmonischen Oszillation in Abb. 4.2c zeigt eine stetig ansteigende Amplitude, die nach einem Maximum bei  $2,72\text{ MHz}$  stetig abfällt. Im Vergleich dazu zeigt die anharmonische Oszillation in Abb. 4.2d an der Stelle der Resonanzfrequenz einen scharfen Übergang von kleiner zu großer Amplitude. Dieser Sprung ist bei  $f_{0,opt} = 2,56\text{ MHz}$ .

Zusätzlich ist für einen qualitativen Vergleich der Untersuchungsmethoden die Amplitude des simulierten elektrischen Stroms aus Abb. 3.7b nach [13] für einen Sensor mit  $52\mu\text{m}$  Durchmesser dargestellt (Abb. 4.2e und Abb. 4.2f), wie in Kap. 3.2 beschrieben. Im Vergleich zu den elektrisch und optisch gemessenen Amplituden befinden sich aufgrund des Sensordurchmessers die Frequenzen und elektrischen Spannungen der simulierten Amplituden in einem anderen Bereich. Auf die Abhängigkeit vom Sensordurchmesser wird später eingegangen. Diese Darstellung zeigt, dass die Form der Amplitude unabhängig von der Untersuchungsmethode ist.

In Abb. 4.2 sind zwei Unterschiede zwischen den Signalen im harmonischen Bereich (Abb. 4.2a, c und e) und den Signalen im anharmonischen Bereich (Abb. 4.2b, d und f) zu erkennen: Im anharmonischen Bereich zeigt das Signal einen Amplitudensprung und die Amplitudenmaxima und -minima sind zu kleineren Frequenzen verschoben. Der Amplitudensprung entsteht durch den nichtlinearen Effekt, der in Kap. 2.2 erläutert ist.

Die Verschiebung zu kleineren Frequenzen wird durch den Spring-Softening Effekt bewirkt, der in Kap. 2.2 beschrieben ist. Bei kleiner Biasspannung in Abb. 4.2a liegt das Amplitudenmaximum bei  $2,73\text{ MHz}$  und das Minimum bei  $2,75\text{ MHz}$ . Bei großer Biasspannung in Abb. 4.2b liegt das Maximum bei  $2,59\text{ MHz}$  und das Minimum bei  $2,67\text{ MHz}$ . Die optische Amplitude ist von  $2,72\text{ MHz}$  auf  $2,56\text{ MHz}$  verschoben. Der Einfluss der Spannungen auf die Amplitude und die Resonanzfrequenzen werden in Abschn. 4.1.2 näher erläutert.

Beide Effekte wurden elektrisch gemessen, optisch verifiziert und theoretisch geprüft. Damit wurde gezeigt, dass der nichtlineare Effekt und der Spring-Softening Effekt Einfluss auf die elektrostatische Anregung des Sensors haben und unabhängig von der Untersuchungsmethode sind.

#### 4 Ergebnisse

Der scharfe Übergang der Amplitude findet an der Position  $f_0$  der Resonanzfrequenz statt. Im Gegensatz zur Amplitude des harmonischen Oszillators ermöglicht der scharfe Übergang eine genauere Bestimmung seiner Position und damit seiner Resonanzfrequenz. Die Ergebnisse der Resonanzfrequenz und deren Stabilität werden in Abschn. 4.1.2 näher erläutert.

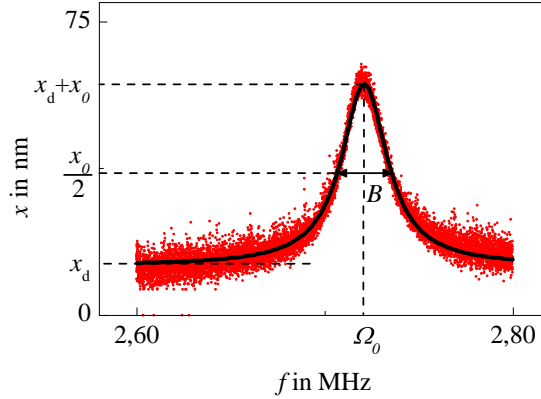


Abbildung 4.3: Frequenzscan eines Sensors mit 96 µm Durchmesser zur Bestimmung des Gütefaktors. Optisch gemessene Amplitude (rot) und Korrelation einer Lorentz-Kurve (schwarz).

Die harmonische Oszillation in Abb. 4.2c zeigt einen weiteren Effekt: Die Amplitude der Auslenkung zeigt die Form einer Lorentzkurve. Deshalb wird die Messung mit einer kleineren Frequenzauflösung von 10 Hz wiederholt, um aus der Halbwertsbreite und der Resonanzfrequenz den Gütefaktor zu bestimmen. Bei Spannungen von  $U_{DC,1} = 2\text{ V}$  und  $U_{AC} = 2\text{ V}$  wird die Frequenz von 2,60 MHz bis 2,80 MHz gefahren. Die Amplitude der Auslenkung wird optisch gemessen (Abb. 4.3).

Eine Lorentz-Kurve der Amplitude ergibt einen Spitzenwert von  $x_0 = 46\text{ nm}$ , eine Halbwertsbreite von  $B = 30\text{ kHz}$  und eine Resonanzfrequenz von  $\Omega_0 = 2,72\text{ MHz}$ . Mit Gl. 2.8 und Gl. 2.7 folgt für den Gütefaktor  $Q = 90$  und für den Dämpfungsfaktor  $\zeta = 0,0055$ .

Die Qualität von MEMS-Resonatoren wird über den dimensionslosen Gütefaktor  $Q$  charakterisiert, wie in Kap. 2.1 beschrieben ist. Park et al. hat mit einem CMUT-Array einen Gütefaktor von 140 gemessen [15], dessen runde Membranstruktur ähnlich der Struktur des Drucksensors in dieser Arbeit ist. Typische Werte liegen für MEMS-Resonatoren zwischen  $10^3$  und  $10^5$  [8]. Wird der Druck auf 140 mbar redu-

ziert, ergibt sich aus der optischen Messung an einem Sensor mit  $96\text{ }\mu\text{m}$  Durchmesser ein Gütefaktor von bis zu 500. Die hier ermittelte Güte liegt aufgrund der verwendeten Messtechnik deutlich unter den typischen Werten von MEMS-Resonatoren. Um eine höhere Auflösung zu erhalten, werden kleinere Sensoren im anharmonischen Bereich betrieben und elektrisch vermessen. Aufgrund des scharfen Amplitudensprungs wurde ein Gütefaktor von etwa 9000 an einem Sensor mit  $70\text{ }\mu\text{m}$  Durchmesser gemessen, sowohl in Atmosphärendruck als auch bei 140 mbar. Der Amplitudensprung ist im anharmonischen Bereich nur noch von den gewählten Frequenzschritten und der Messtechnik abhängig, daher werden für ein hohes Auflösungsvermögen kleine Frequenzschritte gewählt und der Gütefaktor wird in den folgenden Messungen nicht weiter betrachtet.

##### 4.1.2 Charakterisierung der Resonanzfrequenz

Die elektrische Messung aus Abb. 4.2b und die optische Messung aus Abb. 4.2d werden an einem weiteren Sensorpaar wiederholt. Beide Sensoren liegen unmittelbar nebeneinander auf demselben Sensorchip und haben einen Durchmesser von  $96\text{ }\mu\text{m}$ . Sie unterscheiden sich nur in der Massenbelegung: ein Sensor ist mit einer dünnen Goldschicht belegt, der andere Sensor bleibt als Referenz ohne Masse. In diesem Abschnitt werden die gemessenen Amplituden als Beispiel vorgestellt und daran die Bestimmung der Resonanzfrequenz erläutert. Die Bestimmung der Massensensitivität aus der Resonanzfrequenz wird in Kap. 4.2 ausführlich beschrieben.

Die Sensoren werden mit elektrischen Spannungen von  $U_{\text{DC}} = 6\text{ V}$  und  $U_{\text{AC}} = 2\text{ V}$  ausgelenkt. Die Frequenz der Wechselspannung wird von 2,50 MHz bis 2,80 MHz gefahren. Die elektrisch und die optisch gemessenen Amplituden sind in Abb. 4.4a und Abb. 4.4b aufgetragen. In Abb. 4.4c und Abb. 4.4d sind die jeweiligen Ableitungen der Amplituden dargestellt. Aus der Extremstelle der Ableitung werden die Resonanzfrequenz  $f_0$  des Referenzsensors und die Resonanzfrequenz  $f_1$  des Sensors mit hinzugefügter Masse ermittelt und die Differenz  $\Delta f$  berechnet. In Tab. 4.1 sind die Ergebnisse der gemessenen Resonanzfrequenzen im Vergleich zwischen den Messmethoden dargestellt. Aus der elektrischen Messmethode ergibt sich eine Frequenzverschiebung von 600 Hz. An demselben Sensorpaar wird optisch eine Frequenzverschiebung von 2400 Hz ermittelt. Daraus ergibt sich, dass die Differenz  $\Delta f$  in der optischen Messmethode um einen Faktor 4 größer ist als in der elektrischen Messmethode.

Abbildung 4.4 zeigt, dass die Frequenzverschiebung  $\Delta f = 600\text{ Hz}$  relativ klein ist

#### 4 Ergebnisse

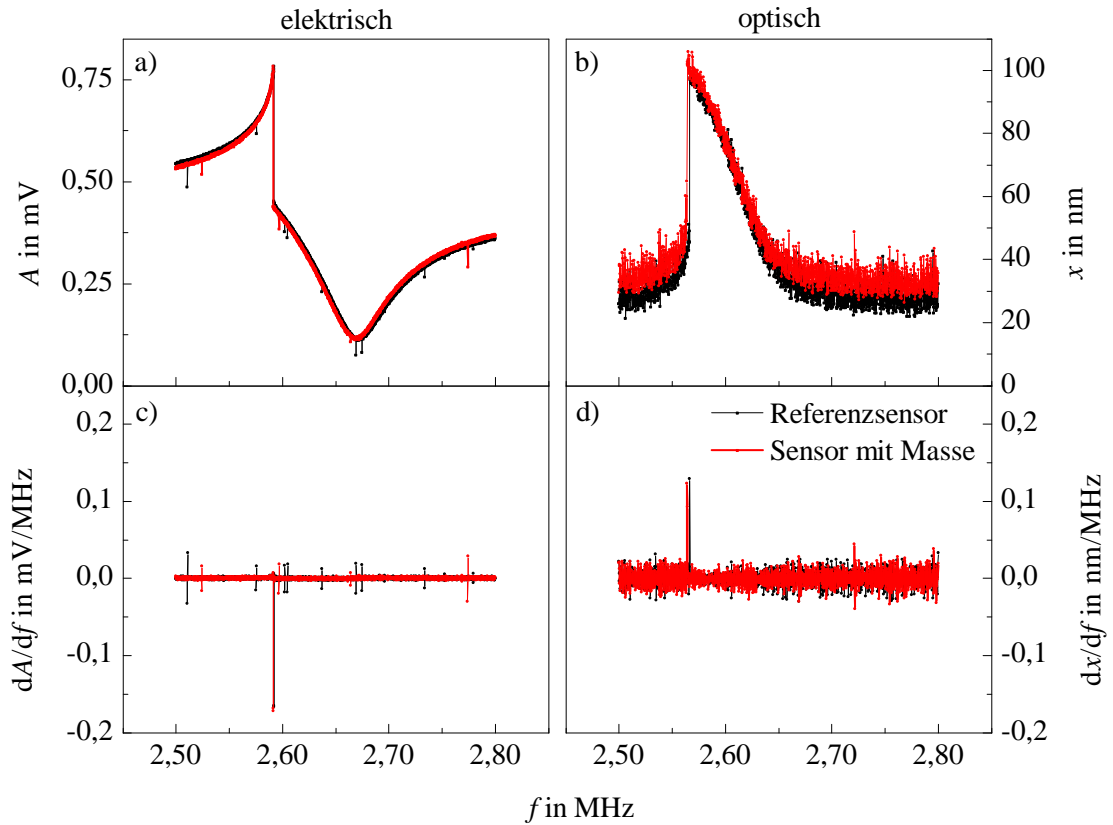


Abbildung 4.4: Frequenzscans von zwei Sensoren mit 96 µm Durchmesser. Ein Referenzsensor ist ohne Masse (schwarz) und ein Sensor mit Masse (rot). (a) Elektrisch gemessene Amplitude und (c) deren Ableitung. (b) Optisch gemessene Amplitude und (d) deren Ableitung.

gegenüber der zu scannenden Frequenz im Megahertzbereich. Aus diesem Grund ist ein hohes Auflösungsvermögen der Resonanzfrequenz nötig. Dies wird durch Messungen im anharmonischen Bereich ermöglicht, da der nichtlineare Effekt einen scharfen Amplitudensprung verursacht.

Die Ableitungen der Amplitudensprünge in Abb. 4.4 zeigen einen hohen Peak mit einer Halbwertsbreite von 2 Messpunkten. Dies verdeutlicht, dass die Genauigkeit der Resonanzfrequenz vom Auflösungsvermögen der gewählten Frequenzschritte und der Stabilität des Systems abhängig ist.

Die Resonanzfrequenzen werden vom Messprogramm automatisch ermittelt. Dafür wird die elektrische Amplitude gemessen, abgeleitet und die Extremstelle wird be-

#### 4.1 Charakterisierung des Resonanzverhaltens

Tabelle 4.1: Vergleich der elektrisch und optisch gemessenen Resonanzfrequenzen eines Sensorpaares mit je 96  $\mu\text{m}$  Durchmesser.

	elektrisch	optisch
$f_0$ [MHz]	2,5921	2,5664
$f_1$ [MHz]	2,5915	2,5640
$\Delta f$ [Hz]	600	2400

stimmt, wie es anhand von Abb. 4.4 beschrieben ist. Die Resonanzfrequenz wird gespeichert. Um genauer zu messen, wird der Frequenzscan auf den Resonanzbereich reduziert und die Frequenzschritte werden verkleinert. Das ermöglicht es, in Messreihen die Resonanzfrequenz zu charakterisieren.

#### Stabilität der Resonanzfrequenz

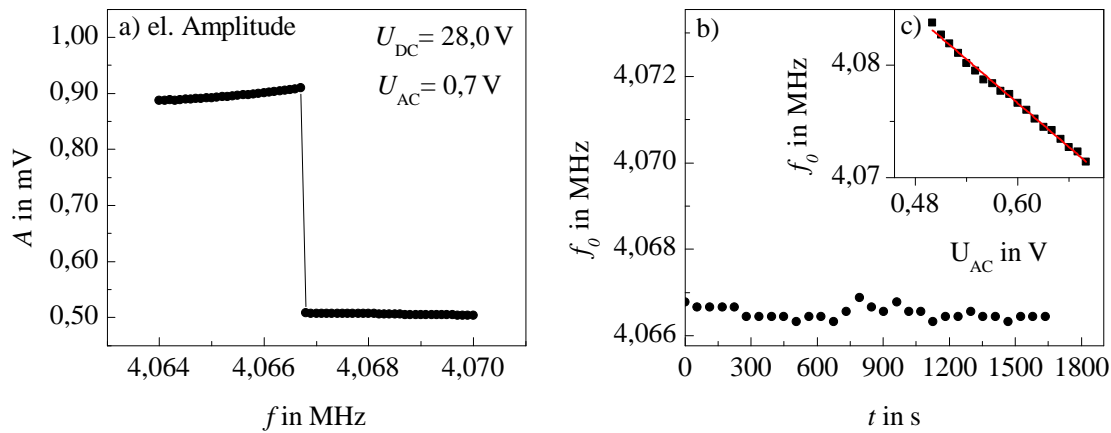


Abbildung 4.5: Experimentelle Ergebnisse der Resonanzfrequenzen eines Sensors mit 70  $\mu\text{m}$  Durchmesser bei Spannungen von  $U_{DC} = 28,0 \text{ V}$  und  $U_{AC} = 0,7 \text{ V}$ . (a) Frequenzscan. (b) Stabilität und (c) Abhängigkeit von Amplitudenschwankungen der Resonanzfrequenz.

Ein Sensor mit 70  $\mu\text{m}$  wird mit elektrischen Spannungen von  $U_{DC} = 28,0 \text{ V}$  und  $U_{AC} = 0,7 \text{ V}$  ausgelenkt. Die Frequenz der Wechselspannung wird 30 Mal von 4,064 MHz bis 4,070 MHz in 100 Hz Schritten gefahren. Die Amplituden werden elektrisch mit dem Lock-In Verstärker gemessen. Eine Amplitude ist exemplarisch in Abb. 4.5a dargestellt. Abbildung 4.5b zeigt die Stabilität der Resonanzfrequenz. Zusätzlich wird an demselben Sensor die Wechselspannung  $U_{AC}$  von 0,5 V bis 0,7 V

## 4 Ergebnisse

in 10 mV Schritten gefahren, um den Einfluss von Amplitudenschwankungen der Wechselspannung auf die Resonanzfrequenz zu untersuchen (Abb. 4.5c).

Die maximale Abweichung der Stabilität ist hier 500 Hz. Im Vergleich zu der Differenzfrequenz  $\Delta f = 600$  Hz wegen der variablen Masse ist dies zu groß. Deshalb wurde der Stanford DS345 Generator auf Amplitudenschwankungen untersucht (Abb. 4.5c). Die Resonanzfrequenz in Abb. 4.5c sinkt mit steigender elektrischer Spannung um 65 kHz/V. Mit einem Oszilloskop, das direkt am Ausgang des Generators geschaltet ist, wird eine Amplitudenungenauigkeit von 6,5 mV gemessen. Das ergibt, dass die  $3\sigma$ -Abweichung von 500 Hz von den Amplitudenschwankungen des Generators kommen kann. Die Amplitudenschwankungen können beispielsweise durch einen selbstgebaute Generator auf Platinen-Ebene reduziert werden. Eine Alternative ist, die Frequenzschritte zu reduzieren und die Biasspannung zu variieren.

Weitere Optimierungen der Stabilität werden durch Variation der Spannungen und der Sensoren durchgeführt. Im Folgenden wird die Resonanz in Abhängigkeit von den elektrischen Spannungen untersucht.

### Abhängigkeit von elektrischen Spannungen

Der Einfluss der elektrischen Spannung ist exemplarisch in Abb. 4.2 zu Beginn des Kapitels erklärt worden und wird nun genauer untersucht.

Die Frequenz der Wechselspannung wird von 3,7 MHz bis 4,2 MHz in 1 kHz Schritten gefahren. Vor jedem Frequenzscan wird die Biasspannung  $U_{DC}$  um 1 V von 5 V bis 22 V erhöht. Die Wechselspannung  $U_{AC} = 1$  V bleibt dabei konstant. Die elektrischen Amplituden sind in Abb. 4.6a dargestellt. Hier ist zu erkennen, dass mit höherer Biasspannung die Amplitude ansteigt und sich zu kleinerer Frequenz verschiebt. Zusätzlich wird bei konstanter Biasspannung von 22,0 V die Wechselspannung mit jedem Scan um 0,5 V von 1,0 V auf 4,5 V erhöht. Die Frequenzscans sind in Abb. 4.6b dargestellt.

Die resultierenden Ableitungen und Resonanzfrequenzen sind in Abb. 4.6c und Abb. 4.6d aufgetragen. Mit steigender Biasspannung verschiebt sich die Position zu kleineren Frequenzen aufgrund des Spring-Softening Effekts. Der Amplitudensprung steigt dabei proportional zum Quadrat der Biasspannung, wie in Kap. 2.2 erklärt ist.

Der Amplitudensprung steigt bis zu einem Wert von  $U_{AC} = 3,5$  V proportional zur Wechselspannung (Abb. 4.6d). Bei höherer Wechselspannung zeigt die Amplitude Fluktuationen nach dem Sprung. Aus diesem Grund wird die Wechselspannung so

#### 4.1 Charakterisierung des Resonanzverhaltens

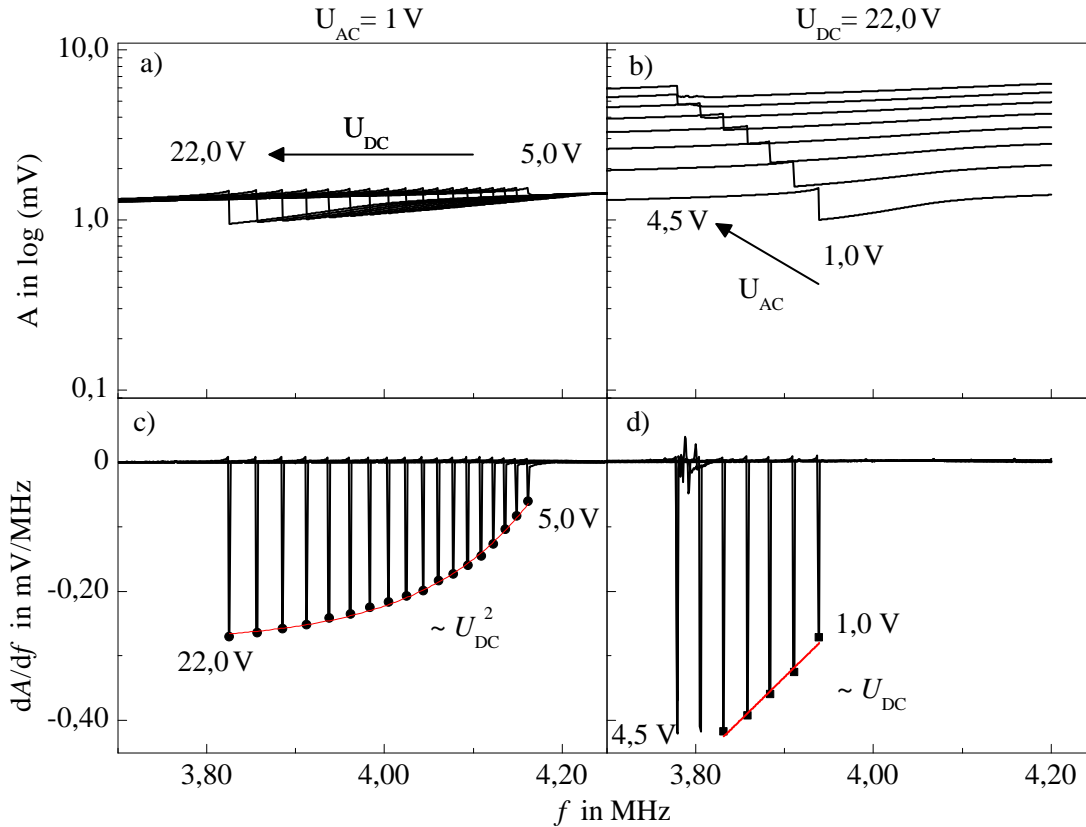


Abbildung 4.6: Experimentelle Ergebnisse der Resonanzfrequenzen eines Sensors mit 70 µm Durchmesser in Abhängigkeit von elektrischen Spannungen bei (a)  $U_{AC} = 1,0 \text{ V}$  und (b)  $U_{DC} = 22,0 \text{ V}$ . Frequenzscans zu (a) unterschiedlichen Biasspannungen und (b) Wechsellspannungen. (c)-(d) Ableitungen (schwarze durchgezogene Linien) und deren Resonanzfrequenzen (Marker), die (c) mit einer quadratischen Funktion und (d) mit einer linearen Funktion korreliert werden (rote durchgezogene Linien).

gewählt, dass die Sprünge deutlich zu sehen sind. Dabei gilt, dass Sensoren mit kleinerem Durchmesser eine höhere Anregungskraft benötigen. Schwankungen in der Stabilität werden dann durch eine höhere Biasspannung reduziert.

Optimale Parameter für die elektrischen Spannungen sind im folgenden Experiment für Sensoren unterschiedlicher Durchmesser ermittelt worden.

#### Abhängigkeit vom Durchmesser der Sensormembran

Der Sensor mit 96 µm Durchmesser in Abb. 4.4 hat eine Resonanzfrequenz bei 2,60 MHz. Der Sensor mit 70 µm Durchmesser in Abb. 4.5 hat eine Resonanzfre-



## 4 Ergebnisse

quenz bei 4,07 MHz. Der Vergleich zeigt, dass die Resonanzfrequenz von der Größe des Sensors abhängig ist. Dieses und die Abhängigkeit von der Anzahl an Sensoren werden am Ende dieses Kapitels untersucht.

Das Experiment aus Abb. 4.4a wird an Sensoren mit unterschiedlichen Durchmessern wiederholt. Während in Abb. 4.4 die Sensoren getrennt voneinander gemessen worden sind, werden nun die nebeneinander liegenden Sensoren parallel angeregt und ausgelesen. Die Differenz der Resonanzfrequenzen zueinander erleichtert die Bestimmung der Massensensitivität in Kap. 4.2.

Tabelle 4.2: Optimale Spannungsparameter für Sensoren mit 60  $\mu\text{m}$ , 70  $\mu\text{m}$  und 96  $\mu\text{m}$  Durchmesser.

$2 R_m$ [ $\mu\text{m}$ ]	60	70	96
$f_0$ [MHz]	5,4	4,2	2,6
$U_{AC}$ [V]	1,5	1,0	0,5
$U_{DC}$ [V]	28,0	28,0	5,0

Die Spannungen sind so gewählt, dass die elektrischen Amplituden zwei scharfe Übergänge zeigen. Die Sensoren mit 96  $\mu\text{m}$  Durchmesser werden mit kleinen Spannungen von  $U_{AC} = 0,5 \text{ V}$  und  $U_{DC} = 5 \text{ V}$  angeregt, um Membranschäden aufgrund der starken Durchbiegung im Verhältnis zum Membrandurchmesser zu vermeiden. Die Sensoren mit 60  $\mu\text{m}$  bzw. 70  $\mu\text{m}$  Durchmesser werden mit den Spannungen  $U_{DC} = 28 \text{ V}$  und entsprechend  $U_{AC} = 1,5 \text{ V}$  bzw.  $U_{AC} = 1,0 \text{ V}$  angeregt.

Der Scanbereich ist auf den Resonanzbereich reduziert. Das ermöglicht eine höhere Frequenzauflösung und schnellere Messungen. In diesem Fall wird jeder Sensor 30 Mal in 100 Hz Schritten gemessen.

Abbildung 4.7 stellt exemplarisch die Frequenzscans an jeweils zwei Sensoren mit unterschiedlichen Durchmessern  $2 R_m$  und unterschiedlicher Massenbelegung dar.

Im Vergleich zu Abb. 4.4a zeigt die elektrische Amplitude in Abb. 4.7a zwei scharfe Übergänge. Sie liegen hintereinander. Im Vergleich zu den getrennt voneinander gemessenen Sensoren fällt die Amplitude zuerst zur Hälfte ab und anschließend ein weiteres Mal. Anhand des Vergleichs zwischen getrennt und parallel gemessenen Sensoren ist die Überlagerung beider Amplituden zu erkennen.

Der jeweils erste Sprung zeigt die verschobene Resonanz aufgrund zusätzlicher Masse. An der Stelle des zweiten Übergangs ist die Frequenz des Referenzsensors ohne

#### 4.1 Charakterisierung des Resonanzverhaltens

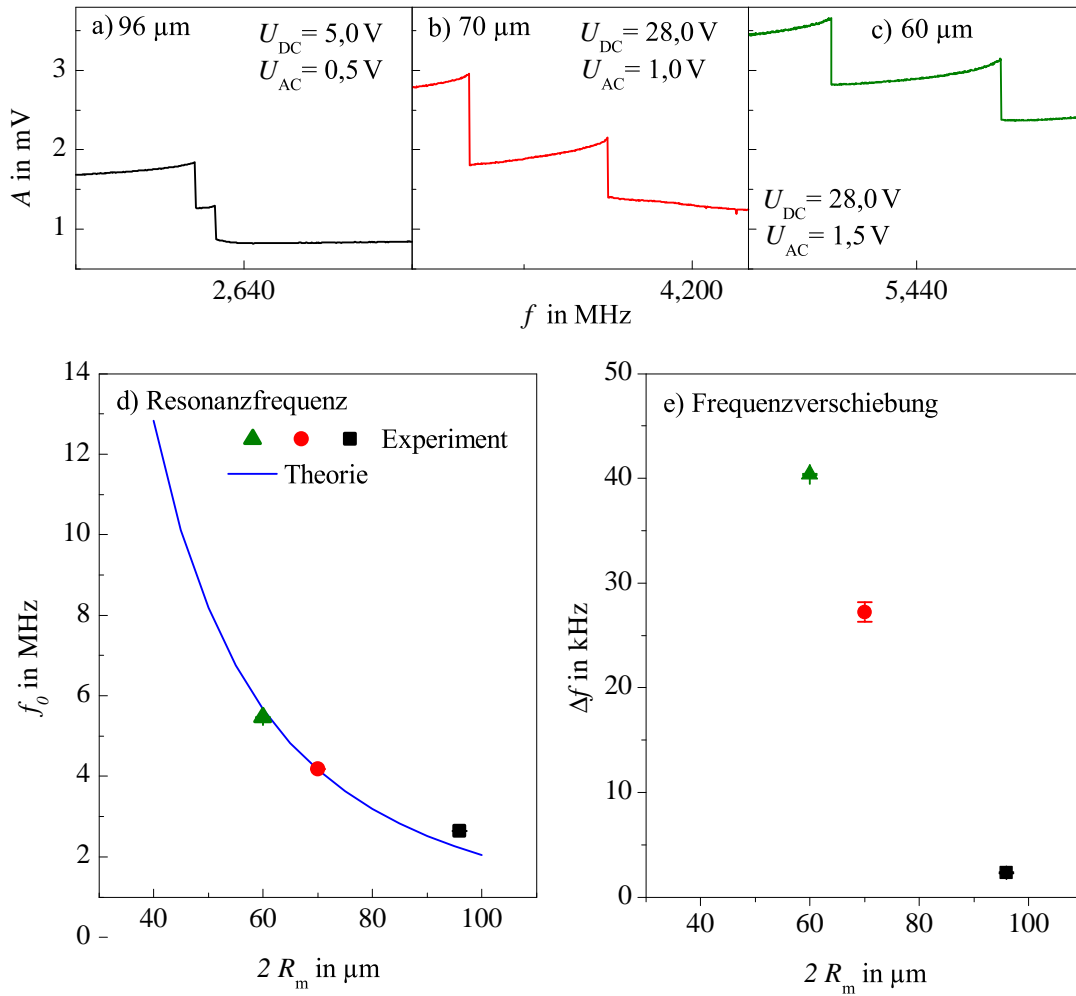


Abbildung 4.7: Experimentelle Ergebnisse an Sensoren mit 60 µm, 70 µm und 96 µm Durchmessern. (a)-(c) Frequenzscans, (d) die resultierenden Resonanzfrequenzen und (e) die resultierenden Frequenzverschiebungen in Abhängigkeit vom Durchmesser. Die blaue durchgezogene Linie zeigt die zu erwartenden Ergebnisse der Resonanzfrequenz nach Simulation.

Masse, also die Resonanzfrequenz. Die Resonanzfrequenzen werden ermittelt und in Abb. 4.7d in Abhängigkeit vom Sensordurchmesser dargestellt. Das Ergebnis der Finite Element Simulation aus Kap. 3.2 ist als durchgezogene Linie ebenfalls eingezeichnet.

Die experimentellen Ergebnisse für 60 µm und 70 µm stimmen mit den simulierten überein. Die Resonanzfrequenz des Sensors mit 96 µm Durchmesser weicht von der

## 4 Ergebnisse

Simulation ab. Leichte Abweichungen von der Resonanzfrequenz können durch die Wahl der elektrischen Spannungen entstehen, wie in Abb. 4.6 gezeigt wurde.

### Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurde das Resonanzverhalten des Sensors charakterisiert.

Eine mechanische Auslenkung der Sensormembran von bis zu 80 nm wurde optisch mit dem Laserinterferometer gemessen. Eine ermittelte Güte von 90 liegt deutlich unter dem Wert von typischen MEMS-Resonatoren. Da jedoch das System für eine höhere Auflösung im anharmonischen Bereich betrieben wird, und daher der Amplitudensprung abhängig ist von der Frequenzauflösung, ist der Gütefaktor für die Ermittlung der Massensensitivität nicht relevant.

Zwei Effekte beeinflussen die Amplitude und die Resonanzfrequenz: Der nichtlineare Effekt bewirkt, dass die Amplitude einen Sprung zeigt. Dabei ist der nichtlineare Effekt unabhängig von der Untersuchungsmethode. Der Spring-Softening Effekt bewirkt, dass sich die Resonanzfrequenz mit steigender Biasspannung zu kleineren Frequenzen verschiebt und dass die Amplitude mit dem Quadrat der Biasspannung steigt. Die Resonanzfrequenz und die Amplitude können also durch die Biasspannung angepasst werden. Dabei gilt, je größer die Biasspannung, desto größer und stabiler der Sprung.

Erste Messungen an Sensorpaaren mit unterschiedlicher Massenbelegung zeigen verschiedene Resonanzfrequenzen. Die Differenz von 600 Hz ist klein im Vergleich zum Messbereich. Auch zeigt eine erste Stabilitätsmessung eine maximale Abweichung von  $3 \sigma = 500$  Hz. Die Spannungen wurden an den Sensordurchmesser angepasst (Tab. 4.2). Die Auflösung der Frequenzschritte wurde so gewählt, dass der Amplitudensprung ausreichend groß und stabil genug ist, um Frequenzverschiebungen aufgrund zusätzlicher Masse nachzuweisen. So ergeben die Resonanzfrequenzen aus mehreren hintereinander durchgeführten Messungen eine relativ stabile Basislinie, welche für den biologische Nachweis in Kap. 4.3 relevant ist.

## 4.2 Auflösungsvermögen des Sensors

In diesem Kapitel werden das Auflösungsvermögen des Sensors bestimmt und die Methoden zur Adhäsion von Partikeln während der Messung untersucht. Der Sensor wird mit dünnen Goldschichten im Pikogrammbereich kalibriert und die Massensensitivitäten von Sensoren unterschiedlicher Durchmesser bestimmt.

Im Anschluss werden die Methoden verglichen, mit denen Nanopartikel und Mikrokugeln auf den Sensor pipettiert und die Effekte der Frequenzverschiebung bei laufender Messung untersucht werden.

### 4.2.1 Charakterisierung mit dünnen Goldschichten

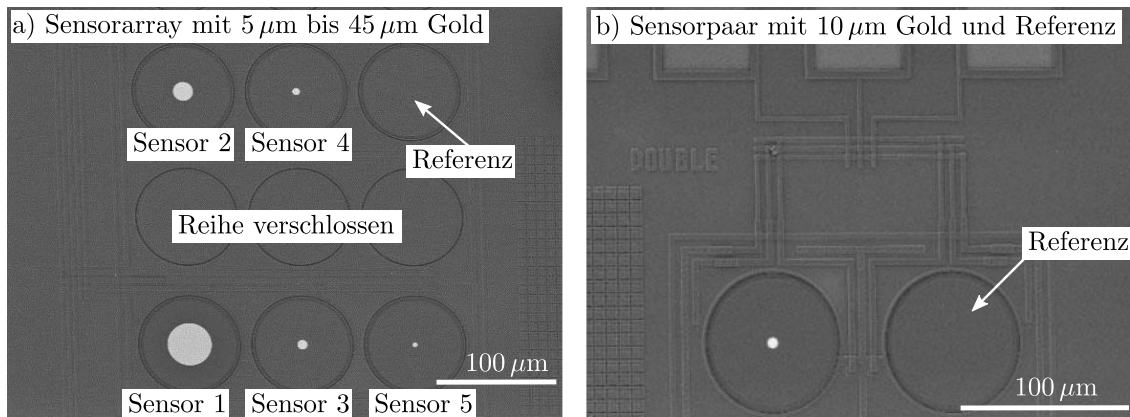


Abbildung 4.8: REM Aufnahmen von dünnen Goldschichten auf großen Sensoren mit 96 µm Durchmesser. (a) Sensorarray mit runden Goldschichten im Durchmesser von 5 µm bis 45 µm. (b) Sensorpaar mit Goldschicht von 10 µm Durchmesser.

Das Auflösungsvermögen des Sensors wird mit dünnen Goldschichten bestimmt. Die Goldschichten werden lithografisch definiert und physikalisch abgeschieden, wie es in Kap. 3.3 beschrieben ist.

Runde Goldschichten im Durchmesser von 5 µm bis 45 µm werden in der Mitte der Sensoroberfläche abgeschieden. In Abb. 4.8 sind REM Aufnahmen von Sensoren mit 96 µm Durchmesser und in Abb. 4.9 sind Sensoren mit 60 µm Durchmesser zu sehen. Der Referenzsensor bleibt jeweils frei von Masse, um die Eigenfrequenz zu messen. Die Anzahl der Sensoren variiert zwischen einzelnen Sensoren, die zu Sensorpaaren zusammengeschlossen werden (Abb. 4.9a), bis hin zu Sensorarrays (Abb. 4.8a).

Die zusätzliche Masse der Goldschichten bewirkt eine Frequenzverschiebung. Die Masse wird aus dem Volumen des Goldkreises bestimmt. Anhand von Abb. 3.17

#### 4 Ergebnisse

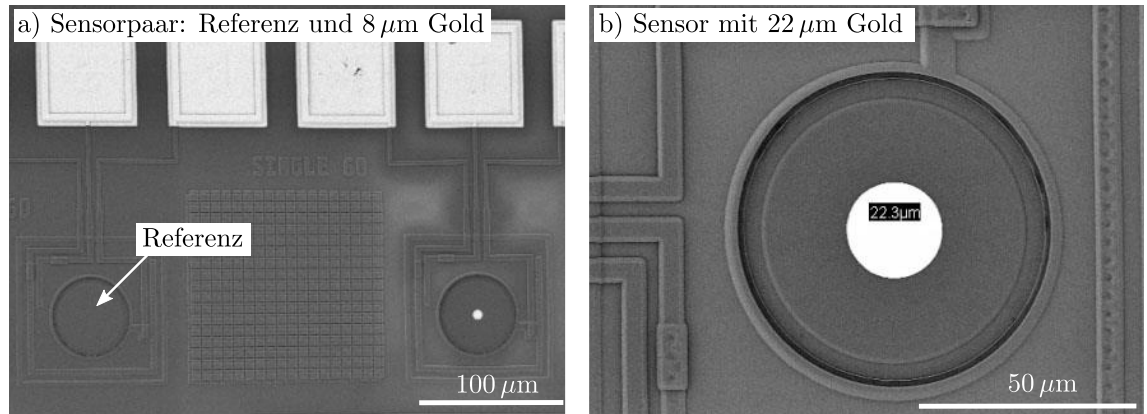


Abbildung 4.9: REM Aufnahmen von dünnen Goldschichten auf kleinen Sensoren mit 60 µm Durchmesser. (a) Sensorpaar mit Goldschicht von 8 µm Durchmesser. (b) Sensor mit Goldschicht von 22 µm Durchmesser.

in Kap. 3.3 wird beschrieben, wie das Volumen aus der gemessenen Topografie bestimmt wird.

Im folgenden Abschnitt werden die Frequenzscans an den Sensoren in Abb. 4.8 und Abb. 4.9 beschrieben. Aus den Frequenzverschiebungen werden die Massensensitivität und das Auflösungsvermögen bestimmt. Zusätzlich wird die Massensensitivität von Sensorpaaren mit 60 µm, 70 µm und 96 µm ermittelt und mit der Theorie verglichen.

##### **Ermittlung der Massensensitivität durch Variation der Masse**

Die Sensoren im Array (Abb. 4.8a) werden mit Spannungen von  $U_{DC} = 5\text{ V}$  und  $U_{AC} = 0,5\text{ V}$  ausgelenkt. Die Frequenz wird von 2,50 MHz bis 2,70 MHz in 100 Hz Schritten gefahren. Ein Frequenzscan ist exemplarisch in Abb. 4.10a dargestellt.

Die Amplitude zeigt für jeden Sensor einen Sprung, also 6 Sprünge insgesamt. Der Sprung bei  $f_0 = 2,656\text{ MHz}$  ist die Eigenfrequenz des Sensors ohne Masse. Die kleinste Verschiebung ( $\Delta f_5 = -12\text{ kHz}$ .) weist Sensor 5 auf, da dieser mit der geringsten Masse bestückt ist und der Sprung somit am nächsten an der Eigenfrequenz liegt.

Die Topografie der Goldkreise wird mit Weißlicht Interferometrie gemessen und daraus das Volumen bestimmt, wie in Kap. 3.3 beschrieben. Aus dem Volumen und der Dichte  $\rho = 19,3\text{ g/cm}^3$  wird die Masse ermittelt. Die Massen liegen im Bereich von 20 pg bis 3000 pg. Sie ergeben Frequenzverschiebungen im Bereich von 11 kHz bis 116 kHz (Abb. 4.10b).

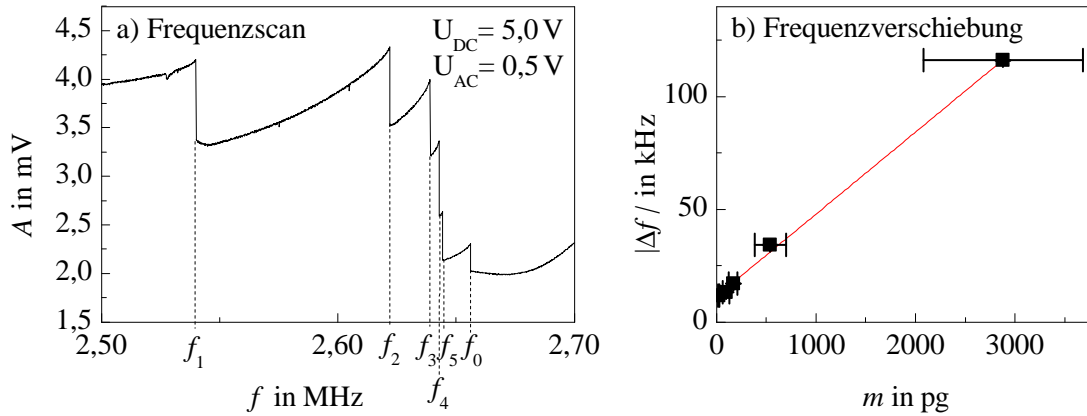


Abbildung 4.10: Experimentelle Ergebnisse eines Arrays von Sensoren im Durchmesser von jeweils  $96 \mu\text{m}$  mit  $50 \text{ nm}$  dünnen Goldschichten im Durchmesser von  $5 \mu\text{m}$  bis  $45 \mu\text{m}$  und einem Referenzsensor ohne Goldschicht. (a) Frequenzscan und (b) die resultierenden Frequenzverschiebungen.

Der Fehleranteil der Frequenzverschiebung ergibt sich aus der Standardabweichung des Mittelwerts von 20 Messungen pro Sensor und ist im Bereich der Marker entlang der  $y$ -Achse in Abb. 4.10b. Der Fehleranteil der Masse wird mit dem Fehlerfortpflanzungsgesetz aus Volumen und Dichte berechnet, wie in Kap. 3.3 beschrieben. Dabei ist der Fehleranteil des Volumens relativ groß wegen der Messungenauigkeit in der Topografiehöhe, die nach Kalibration an Stufenkanten  $25 \text{ nm}$  bei  $100 \text{ nm}$  Topografiehöhe ergibt.

Eine lineare Regression in Abb. 4.10b zeigt, dass die Frequenzverschiebung linear abhängig ist von der Masse. Die Steigung der linearen Regression ist die Massensensitivität  $S = \Delta f / \Delta m = 36,5 \text{ Hz/pg}$ . Es konnte eine kleinste Masse von nur  $20 \pm 7 \text{ pg}$  nachgewiesen werden.

### Massensensitivität von Sensoren unterschiedlicher Durchmesser

Die Massensensitivität, die aus der Frequenzverschiebung ermittelt wird, ist von der Größe des Sensors und seiner Eigenfrequenz abhängig, siehe Gl. 2.1 und Gl. 2.4. Deshalb wird die Massensensitivität von Sensoren unterschiedlicher Durchmesser ermittelt. Dabei werden die Frequenzverschiebungen und die Massen bestimmt, wie anhand des Sensorarrays in Abb. 4.10 gezeigt wurde.

Die Abhängigkeiten der Eigenfrequenz und der Frequenzverschiebung von der Sensorgröße werden in Abb. 4.7 experimentell nachgewiesen. Weitere Sensorpaare, die

#### 4 Ergebnisse

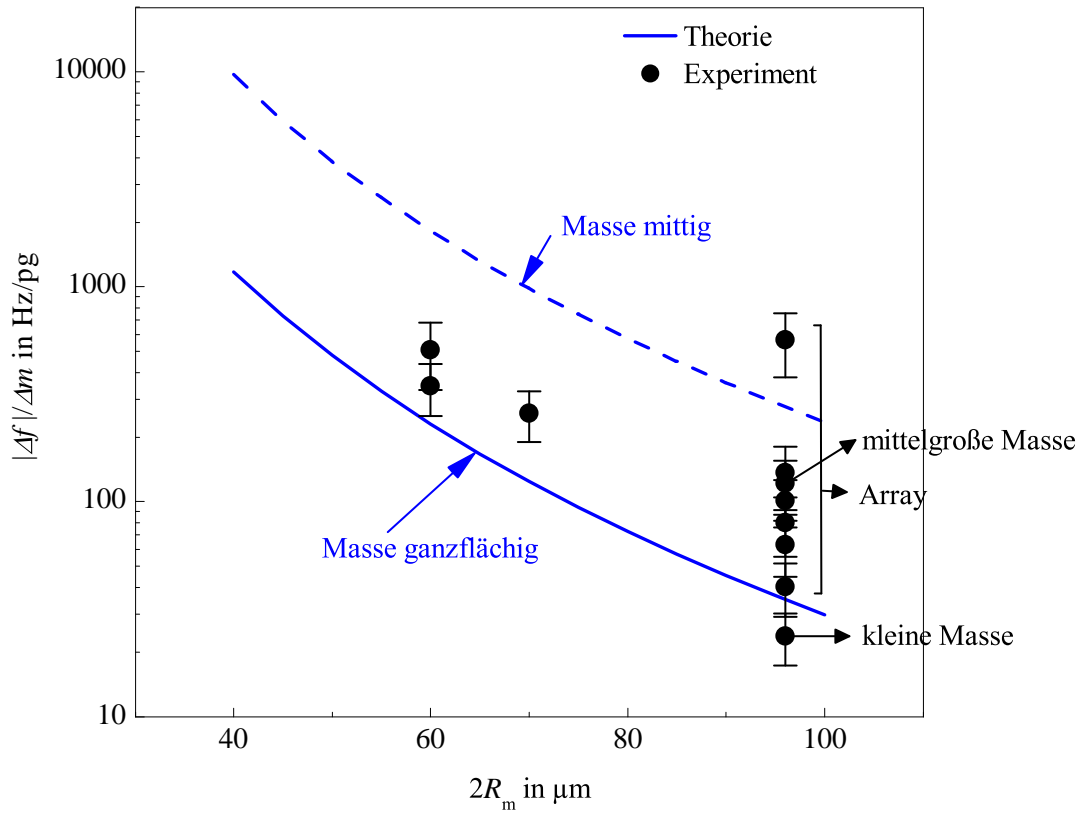


Abbildung 4.11: Massensensitivität in Abhängigkeit vom Sensordurchmesser. Experimentelle Ergebnisse (Marker) im Vergleich zur Theorie bei ganzflächiger (durchgezogene Linie) bzw. zentrierter (gestrichelte Linie) Massenverteilung.

mit dünnen Goldschichten von  $20\,\mu\text{m}$  Durchmesser beschichtet sind, werden untersucht. Die Verschiebung in Bezug auf die Eigenfrequenzen wird ermittelt, durch die jeweilige Masse der Goldschicht differenziert und zusammenfassend als Massensensitivität in Abb. 4.11 dargestellt.

Die zwei theoretischen Linien geben die Extremfälle für unterschiedliche Massenverteilungen an. Sie werden aus der FEM-Simulation ermittelt, die in Kap. 3.2.1 beschrieben ist. Die gestrichelte Linie ist die theoretisch erwartete Massensensitivität für eine Masse, die mittig auf dem Sensor liegt. Die durchgezogene Linie entspricht der theoretischen Sensitivität für eine ganzflächige Massenverteilung auf dem Sensor.

Die experimentell ermittelte Massensensitivität ist in Markern dargestellt. Der Fehleranteil der Massensensitivität ergibt sich aus der Fehlerfortpflanzung. Für Sensoren

mit 60  $\mu\text{m}$  und 70  $\mu\text{m}$  Durchmesser liegen die Massensensitivitäten im theoretisch erwarteten Bereich. Die Massensensitivitäten der 96  $\mu\text{m}$  Sensoren liegen teilweise im theoretisch erwarteten Bereich. Drei verschiedene Sensoren sind in Abb. 4.11 zusammengefasst, die denselben Sensordurchmesser von 96  $\mu\text{m}$  besitzen, aber mit unterschiedlichen Massen belegt sind. An den großen Sensoren wurden Frequenzverschiebungen von bis zu einem Faktor 10 zu klein gemessen. Die Abweichungen können mehrere Ursachen haben: Abweichungen in der FEM-Simulation, die niedrigen Spannungen und die Abweichungen von der theoretisch erwarteten Eigenfrequenz.

Zur Vorbereitung auf das Experiment als Biosensor werden im folgenden Abschnitt Methoden untersucht, um Partikel auf den Sensor während der Messung zu pipettieren und den Effekt der Frequenzverschiebung nachzuweisen.

### 4.2.2 Charakterisierung mit Nanopartikeln und Mikrokugeln

Zwei Methoden der Adhäsion werden untersucht und miteinander verglichen: das manuelle Pipettieren von Mikrokugeln und das automatische Pipettieren von Nanopartikeln.

Ein Sensorpaar mit einem Durchmesser von je 70  $\mu\text{m}$  wird gemessen, während auf einem Sensor Nanopartikel mit dem Nanodispenser pipettiert werden. Bei Spannungen von  $U_{AC} = 1\text{ V}$  und  $U_{DC} = 15\text{ V}$  wird die Frequenz in 2500 Hz Schritten gefahren. Die Frequenzscans sind exemplarisch vor (Abb. 4.12a) und nach (Abb. 4.12b) dem Hinzufügen der Masse dargestellt.

Die Resonanzfrequenzen beider Sensoren werden gemessen und in Abb. 4.12c aufgetragen. Während die Messung läuft, werden zum Zeitpunkt  $t = 1000\text{ s}$  900 pg CdSe-Nanopartikel in 1,8 nl DI Wasser auf einen der beiden Sensoren dispensiert, wie in Kap. 3.3 beschrieben. Die Hellfeld Aufnahme in Abb. 4.12c zeigt die Nanopartikel auf einem Sensor. Der Referenzsensor bleibt frei von Masse.

Die zusätzliche Masse der Nanopartikel verschiebt die Resonanz des Sensors bei  $t = 1000\text{ s}$  um 150 kHz von 4,00 MHz auf 3,85 MHz. Die Resonanz des Referenzsensors bleibt bei 4,00 MHz.

Abbildung 4.12c zeigt den Effekt der Frequenzverschiebung, wenn während der laufenden Messung Masse auf einen Sensor hinzugefügt wird. Von  $t = 1000\text{ s}$  bis  $t = 1600\text{ s}$  benötigt der Sensor Zeit, damit der Tropfen vollständig verdunstet und sich die Frequenz nach dem Dispensieren einpendelt. Ab  $t = 1600\text{ s}$  bleibt der Sensor stabil.



#### 4 Ergebnisse

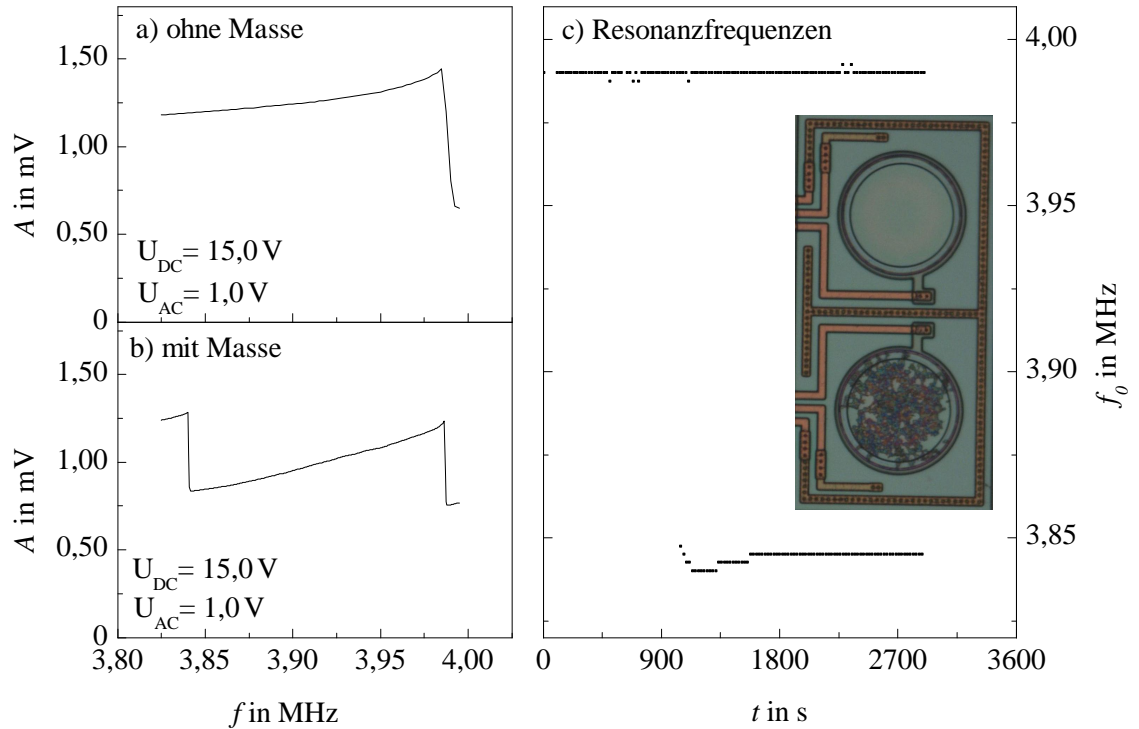


Abbildung 4.12: Experimentelle Ergebnisse eines Sensorpaares im Durchmesser von jeweils  $70\text{ }\mu\text{m}$ . Frequenzscans (a) vor und (b) nach dem Dispensieren von Nanopartikeln auf den Sensor. (c) Resonanzfrequenzen und Hellfeld Aufnahmen der Sensoren im Lichtmikroskop mit und ohne dispensierten Nanopartikeln, nach [62].

Das gleichzeitige Anregen und Auslesen des Sensorpaares hat den Vorteil, dass ein Sensor als Referenz verwendet werden kann, während die Masse des anderen Sensors variiert wird. Die Differenz zwischen den Resonanzfrequenzen beider Sensoren ist die Frequenzverschiebung aufgrund von zusätzlicher Masse. In diesem Fall hat sich die Frequenz um  $150\text{ kHz}$  verschoben. Das ergibt eine Massensensitivität von  $167\text{ Hz/pg}$  und liegt im unteren Bereich des theoretisch erwarteten Wertes von  $120\text{ Hz/pg}$  bis  $1000\text{ Hz/pg}$ , siehe Abb. 3.6b in Kap. 3.2.

Als nächstes wird untersucht, ob die Verschiebung auf einem Sensor wiederholt werden kann. Dies wird mit Mikrokugeln statt Nanopartikeln untersucht, da die Masse der Mikrokugeln, die auf dem Sensor sind, über die Anzahl bestimmt wird. Ein Versuch mit Mikrokugeln am Nanodispenser hat gezeigt, dass die Mikrokugeln in der Kapillarspitze agglomerieren und sie so verstopfen. Deshalb werden die Mikrokugeln manuell in größerem Volumen auf den Sensor pipettiert.

## 4.2 Auflösungsvermögen des Sensors

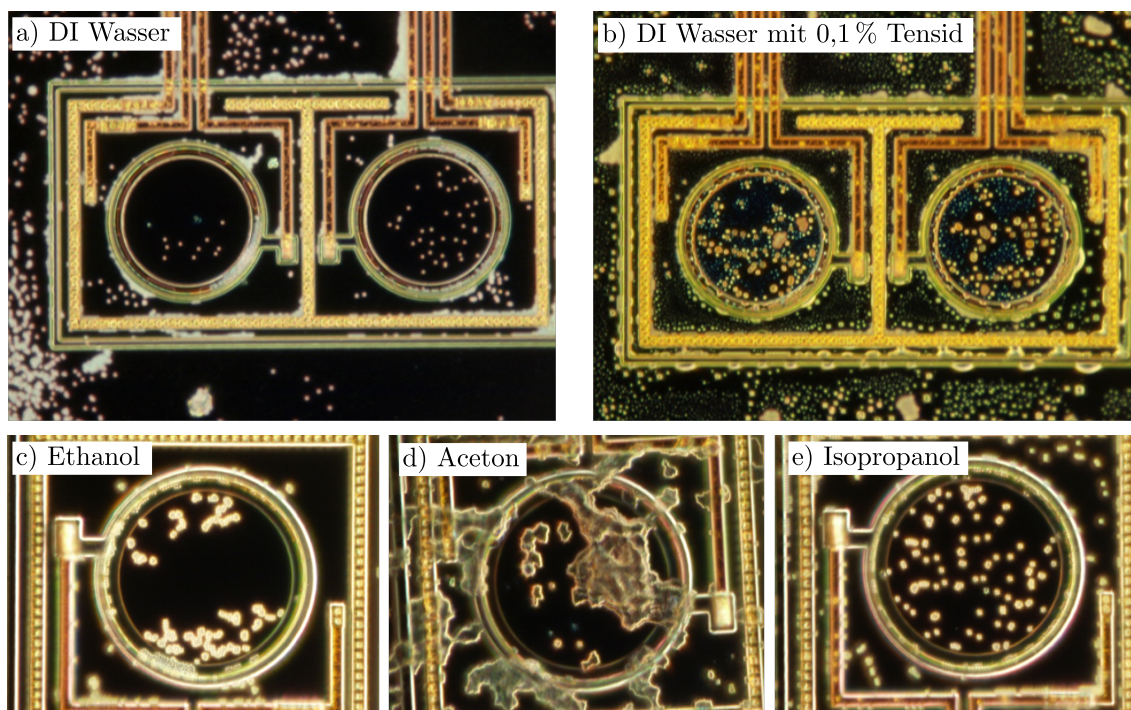


Abbildung 4.13: Dunkelfeldaufnahmen zur Voranalyse. Verteilung der Mikrokugeln auf Sensoren nach Pipettieren und Verdunsten von je 1 µl (a) DI Wasser, (b) DI Wasser mit 0,1 % Tensid, (c) Ethanol, (d) Aceton und (e) Isopropanol.

Das Pipettieren von Mikrokugeln auf die Sensoroberfläche erfordert die gleichmäßige Verteilung der Kugeln und die rückstandsfreie Verdunstung der Flüssigkeit. Die Eigenschaften der Mikrokugeln und die hydrophobe Sensoroberfläche haben einen starken Einfluss auf die Verteilung beim Verdunsten der Flüssigkeit. Dies wird im Folgenden untersucht, bevor die Massensensitivität mit Mikrokugeln bestimmt wird. Die Mikrokugeln werden jeweils zu einer Konzentration von 0,1 mg/ml in verschiedenen Flüssigkeiten verdünnt. Je 1 µl wird auf einen unbehandelten Sensorchip pipettiert. Unter dem Lichtmikroskop wird beobachtet, wie sich die Mikrokugeln auf der Sensoroberfläche verteilen.

Die Wahl der zu untersuchenden Flüssigkeiten, in denen die Mikrokugeln verdünnt werden, orientiert sich an den Herstellerangaben der Mikrokugeln und der hydrophoben Eigenschaft der Sensoroberfläche. Wegen der rückstandslosen Verdunstung wird destilliertes Wasser (Abb. 4.13a) getestet. Laut Hersteller verhindert die Beimischung eines Tensids im Wasser die Agglomeration der Mikrokugeln. Deshalb wird das Tensid Polyethylene glycol tert-octylphenyl ether (Triton X-100) zu 0,1 %

#### 4 Ergebnisse

dem Wasser beigemischt (Abb. 4.13b). Zusätzlich werden aufgrund der hydrophoben Sensoroberfläche die Mikrokugeln in Lösemittel Ethanol (Abb. 4.13c), Aceton (Abb. 4.13d) und Isopropanol (Abb. 4.13e) verdünnt und untersucht.

Das Tensid und das Lösemittel Aceton hinterlassen Rückstände. Wasser und Ethanol zeigen zwar keine Rückstände, aber die Mikrokugeln haben sich nur auf dem halben Sensor verteilt. Isopropanol zeigt in Abb. 4.13e das beste Ergebnis. Die Mikrokugeln sind gleichmäßig auf dem Sensor verteilt und die Flüssigkeit hinterlässt keine Rückstände. Der Tropfen Isopropanol verdunstet schneller als Wasser, was sich auf die Verteilung der Mikrokugeln auswirkt. Deshalb wurde die Bestimmung der Massensensitivität mit Isopropanol durchgeführt. Aufgrund des Coffee-Ring-Effekts verteilen sich mehr Mikrokugeln am Tropfenrand als in der Mitte. Die Mikrokugeln werden von kapillaren Kräften zum Tropfenrand gezogen und bleiben dabei an Defekten an der Oberfläche haften. Deshalb sind an den Leiterbahnen und dem Graben um den Sensor mehr Mikrokugeln vorhanden als auf dem Sensor.

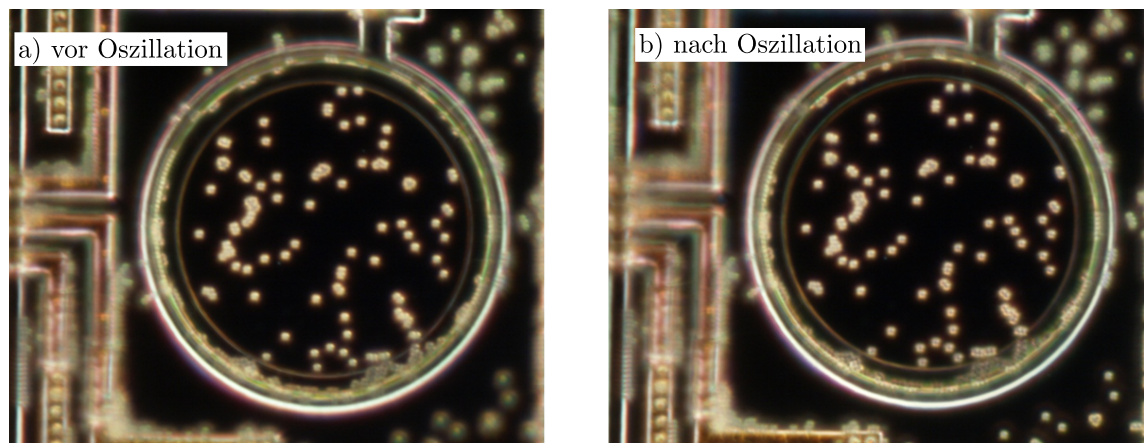


Abbildung 4.14: Dunkelfeldaufnahmen zur Voranalyse (a) vor und (b) nach Oszillation des Sensors bei 4 MHz.

Desweiteren bleibt zu klären, ob sich die Mikrokugeln bei der Oszillation des Sensors verschieben bzw. von der Oberfläche lösen. Dies wird untersucht, indem ein Tropfen Isopropanol mit Mikrokugeln auf einen weiteren Sensor dispensiert und verdunstet wird. Die Sensormembran wird mit  $U_{AC} = 2\text{ V}$  und  $U_{DC} = 28\text{ V}$  zu einer Oszillation angeregt. Die Vibration wird 60 s bei 4 MHz gehalten.

Vor und nach dem Anlegen der elektrischen Spannungen wird der Sensor unter dem Lichtmikroskop untersucht. Abb. 4.14 zeigt die gleichmäßige Verteilung der Mikro-

## 4.2 Auflösungsvermögen des Sensors

kugeln auf dem Sensor vor und nach der Oszillation. Die Mikrokugeln haben sich weder verschoben noch gelöst.

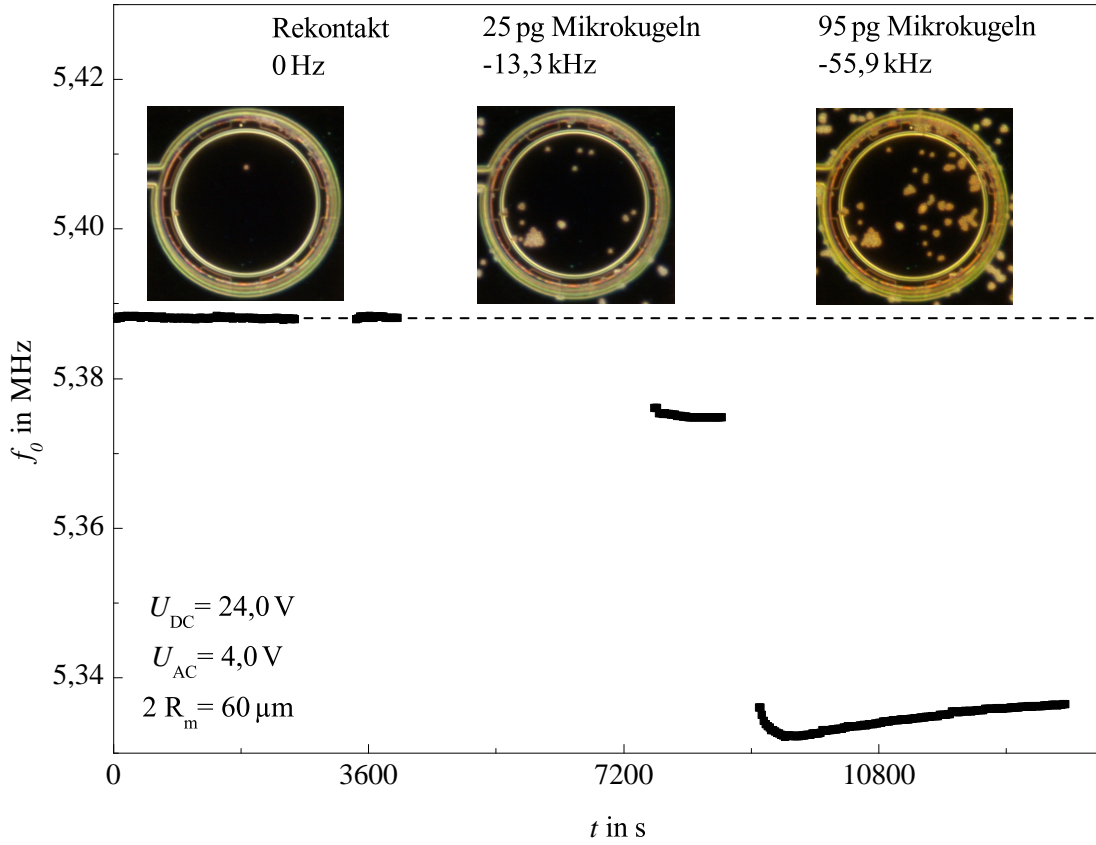


Abbildung 4.15: Resonanzfrequenzen eines Sensors im Durchmesser von  $60 \mu\text{m}$ . Dunkelfeldaufnahmen des Sensors im Lichtmikroskop mit dispensierten Mikrokugeln.

Ein Sensor mit  $60 \mu\text{m}$  Durchmesser und CMOS-integrierter Ausleseschaltung wird mit elektrischen Spannungen von  $U_{AC} = 4$  V und  $U_{DC} = 24$  V ausgelenkt. Die Frequenz ist auf den Resonanzbereich reduziert und wird in 100 Hz Schritten gefahren. Die Resonanzfrequenzen sind in Abb. 4.15 aufgetragen.

Der Sensor mit ROIC ist fest auf eine Platine montiert, wie in Kap. 3.1 beschrieben. Das Rekontaktieren, also das Pausieren der Messung und die Entnahme der Platine aus dem Adaptersystem zur Dokumentation unter dem Lichtmikroskop, verursacht keine Frequenzverschiebung. Dies ist in Abb. 4.15 bei  $t = 3000$  s zu erkennen.

1  $\mu\text{l}$  Tropfen mit Mikrokugeln in Isopropanol wird mehrmals auf den Sensor mit ROIC pipettiert. Die Dunkelfeldaufnahmen in Abb. 4.15 zeigen den Sensor vor und

## 4 Ergebnisse

nach jedem Pipettieren von Mikrokugeln.

Bei  $t = 4000$  s und  $t = 9000$  s wird die Anzahl der Mikrokugeln auf dem Sensor dokumentiert und weitere Mikrokugeln werden dispensiert. Eine Mikrokugel wiegt  $m_{\text{Mikrokugel}} = 0,735$  pg. Die Masse ergibt sich aus dem Durchmesser von  $1,1$   $\mu\text{m}$ , der Dichte von  $1,055$  g/cm<sup>3</sup> und dem Volumen  $V_{\text{Mikrokugel}} = 4/3\pi r^3$  einer Mikrokugel. Die Anzahl der Mikrokugeln auf dem Sensor ist der Reihe nach  $N = 1$ ,  $N = 35$  und  $N = 130$ . Dies ergibt eine zusätzliche Masse von  $25$  pg beim ersten Dispensieren und  $95$  pg beim zweiten Dispensieren.

Die Frequenz hat sich bei  $t = 4000$  s um  $13,3$  kHz und bei  $t = 9000$  s um  $55,9$  kHz verschoben. Das ergibt Massensensitivitäten von  $530$  Hz/pg und  $590$  Hz/pg, was im Bereich des theoretisch erwarteten Wertes von  $220$  Hz/pg bis  $1200$  Hz/pg liegt, siehe Abb. 3.6b in Kap. 3.2.

### Zusammenfassung

Tabelle 4.3: Massensensitivitäten von Sensoren mit  $60$   $\mu\text{m}$ ,  $70$   $\mu\text{m}$  und  $96$   $\mu\text{m}$  Durchmesser.

$2 R_m$ [ $\mu\text{m}$ ]	60	70	96
$f_0$ [MHz]	5,2	4,0	2,4
$U_{\text{AC}}$ [V]	1,5	1,0	0,5
$U_{\text{DC}}$ [V]	28,0	28,0	5,0
$S_{\text{th}}$ [Hz/pg]	230-1800	124-980	30-280
$S_{\text{exp}}$ [Hz/pg]	344-506	234-266	23-570

In diesem Kapitel wurde eine kleine Masse von nur  $20$  pg mit definierten dünnen Goldstrukturen nachgewiesen, die im Post-Prozess auf den Wafer abgeschieden wurden. Die Ergebnisse der Massensensitivität  $S$  und die in der Kalibration verwendeten elektrischen Spannungen  $U_{\text{AC}}$  und  $U_{\text{DC}}$  sind in Tab. 4.3 zusammengefasst. Im Vergleich zu den simulierten Sensitivitäten  $S_{\text{th}}$  aus Abb. 4.11 liegen die gemessenen Massensensitivitäten  $S_{\text{exp}}$  von Sensoren mit  $60$   $\mu\text{m}$  und  $70$   $\mu\text{m}$  Durchmesser mit  $200$  Hz/pg bis  $500$  Hz/pg im theoretisch erwarteten Bereich. Auf den großen Sensoren weicht sie teilweise von der erwarteten Sensitivität ab.

Mit CdSe-Nanopartikeln wurde gezeigt, dass während der laufenden Messung eines Sensorpaares die Masse eines Sensors durch zielgenaues Pipettieren mit dem Nanodispenser variiert werden kann. Dabei bleibt die Frequenz des Referenzsensors

## 4.2 Auflösungsvermögen des Sensors

gleich, während sich die Frequenz des anderen Sensors aufgrund der zusätzlichen Masse verschiebt. In diesem Fall hat sich die Frequenz durch 900 pg Nanopartikel um 150 kHz verschoben. Das ergibt eine Massensensitivität von 167 Hz/pg und liegt im unteren Bereich des theoretisch erwarteten Wertes von 120 Hz/pg bis 1000 Hz/pg. Mit Mikrokugeln in Isopropanol wurde gezeigt, dass die Frequenzverschiebung reproduzierbar ist und dass die Frequenz proportional zur hinzugefügten Masse sinkt. Es wurden Massen von 25 pg beim ersten Pipettieren und 95 pg beim zweiten Pipettieren hinzugefügt. Hieraus resultieren Massensensitivitäten von 530 Hz/pg und 590 Hz/pg, die im Bereich des theoretisch erwarteten Wertes liegen. Dabei lösen oder verschieben sich die Mikrokugeln nicht durch die Oszillation des Sensors.

Der Vergleich zwischen den Methoden zeigt, dass das automatische Pipettieren mit dem Nanodispenser das gleichzeitige Messen und Pipettieren möglich macht. Jedoch ist das Experiment zu aufwändig und die Kapillare sind sehr empfindlich, sodass das manuelle Pipettieren für die folgenden Experimente bevorzugt und auf die Anwendung des Biosensors optimiert wird.

### 4.3 Selektivität des Sensors

In diesem Kapitel wird die Selektivität des Biosensors mit folgenden Zielen untersucht:

- Nachweis der spezifischen Bindung,
- Reproduzierbarkeit,
- Abhängigkeit von der Konzentration der Analyte,
- Nachweis des biologischen Ereignisses.

Als Erstes werden Bindungen mit Streptavidin auf biotinylierten Sensoren untersucht. Dabei werden die Sensoren mit unterschiedlich funktionalisierten Rezeptoren gemessen, die Spülprozesse werden optimiert und Vergleichsmessungen an Sensoren mit zusätzlicher Goldschicht werden durchgeführt.

Anschließend werden Bindungen mit ctxB und dem Antikörper Anti-G<sub>M1</sub> auf G<sub>M1</sub> funktionalisierten Sensoren untersucht.

Für den Nachweis der spezifischen Bindung werden negative Proben mit Analyten verwendet, die nicht an dem Rezeptor auf der Biosensoroberfläche haften bleiben (Tab. 4.4). Dabei wird für die negativen Proben das Protein BSA als Analyt verwendet, da es sich weder an Biotin noch an G<sub>M1</sub> bindet, wie in Kap. 2.3 beschrieben ist.

Tabelle 4.4: Übersicht über die hier verwendeten Analyte, die an die Rezeptoren des Biosensors spezifisch binden (positiv) bzw. nicht binden (negativ) mit dem Verweis auf die experimentellen Ergebnisse an Biosensoren mit Gold- bzw. Siliziumnitrid-Oberflächen.

Analyt	Rezeptor			Biosensoroberfläche	
	Biotin	PEG-Biotin	G <sub>M1</sub>	Siliziumnitrid	Gold
Streptavidin	positiv	positiv	-	Abb. 4.16 4.17 4.18	Abb. 4.19
ctxB	negativ	negativ	positiv	Abb. 4.20	
Anti-G <sub>M1</sub>	negativ	negativ	positiv	Abb. 4.20	
BSA	negativ	negativ	negativ	Abb. 4.19	Abb. 4.18



### 4.3.1 Charakterisierung mit Streptavidin auf Biotin

#### Biotin funktionalisierte Siliziumnitrid-Biosensoren

Die Sensoren werden nach dem Funktionsprinzip untersucht:

- (a) Resonanzfrequenz messen,
- (b) Adhäsion der Biomoleküle an die Sensoroberfläche,
- (c) Spülen und Trocknen,
- (d) Resonanzfrequenz erneut messen.

Das Spülen und Trocknen des Biosensors wird dabei an Siliziumnitrid-Biosensoren untersucht und weiterentwickelt.

Zunächst werden die Sensoren folgendermaßen gespült:

A0: mit Wasser abspülen,

C0: mit Raumluft trocknen,

D0: Sensor elektrisch kontaktieren und die Messung wiederaufnehmen.

Anschließend werden die Spülschritte entwickelt zu

- A: Sensorchip 2 min in 1,5 ml PBS bewegen und anschließend abspülen,
- B: Sensorchip 2 min in 1,5 ml gefiltertem DI Wasser bewegen und anschließend abspülen,
- C: Sensorchip mit Pinzette entnehmen und 30 s unter Stickstofffluss trocknen,
- D: Sensor nach 2 min Pause elektrisch kontaktieren und die Messung wiederaufnehmen.

Alle Sensoren werden zu Beginn eines Experiments mit Wasser gründlich abgespült und getrocknet, um Partikel ausschließen zu können. Von diesem Status wird zu Beginn eine stabile Nulllinie gemessen, von der die Frequenzverschiebungen durch die Spülschritte ermittelt werden.



## 4 Ergebnisse

### Bindung von Streptavidin und funktionalisierten Nanopartikeln

Als Erstes wird der Effekt der Frequenzverschiebung an einem mit Biotin funktionalisierten Biosensor und 60  $\mu\text{m}$  Durchmesser untersucht. Dafür werden der Reihe nach

1. der Sensor gespült und getrocknet,
2. die Resonanzfrequenzen gemessen,
3. 1000  $\mu\text{g/ml}$  Streptavidin auf den Biosensor immobilisiert (pipettiert),
4. der Sensor gespült und getrocknet,
5. die Resonanzfrequenzen mit gebundenem Streptavidin gemessen,
6. 500  $\mu\text{g/ml}$  Biotin funktionalisierte Gold-Nanopartikel auf den Biosensor immobilisiert (pipettiert),
7. der Sensor gespült und getrocknet,
8. die Resonanzfrequenzen mit gebundenen Nanopartikeln gemessen.

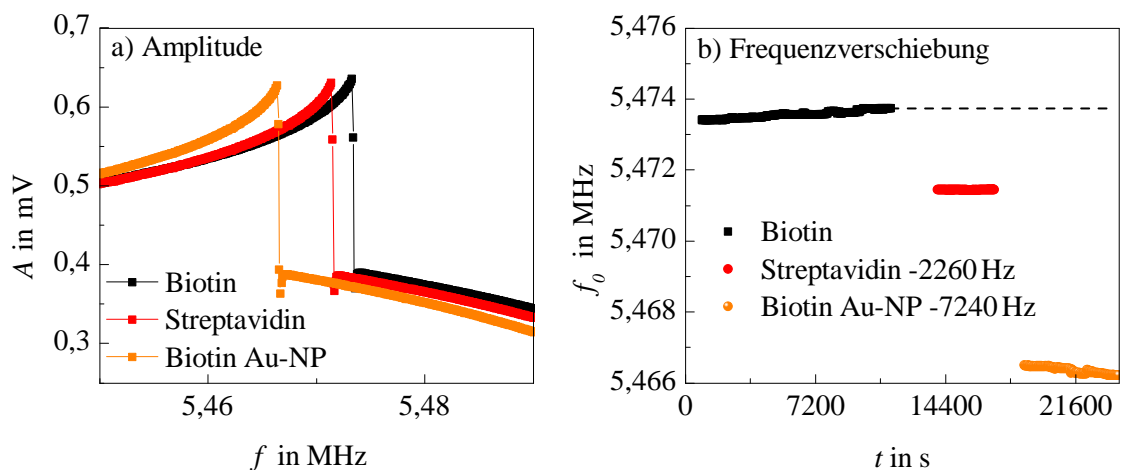


Abbildung 4.16: Experimentelle Ergebnisse der spezifischen Bindung von Streptavidin auf Biosensoren mit Biotin funktionalisierten Siliziumnitrid-Oberflächen. (a) Elektrische Amplitude. (b) Resultierende Frequenzverschiebungen durch Bindung von Streptavidin an Biotin (rot) und Bindung von Biotin funktionalisierten Gold-Nanopartikeln an Streptavidin (orange).

Die Analyte werden auf den Sensor pipettiert, wie im Experiment für Mikrokugeln in Kap. 3.4 beschrieben. Nach einer Adhäsionszeit von  $t_A = 20$  min wird der Sensor 30 s mit DI Wasser gespült und mit Raumluft getrocknet.

Bei elektrischen Spannungen von  $U_{AC} = 2$  V und  $U_{DC} = 28$  V wird die Frequenz in 20 Hz Schritten gefahren (Abb. 4.16a) und die Resonanzfrequenzen werden in Abb. 4.16b und Tab. 4.5 aufgezeichnet.

Das Streptavidin setzt sich auf den Biotin funktionalisierten Biosensor ab und verschiebt die Frequenz um -2260 Hz. Die Gold-Nanopartikel sind Biotin funktionalisiert, das wiederum an das Streptavidin bindet und die Frequenz so um insgesamt -7240 Hz von der Nulllinie verschiebt.

Damit wurde qualitativ gezeigt, dass sich Analyte an den Biosensor absetzen und sich das Streptavidin an Biotin bindet. Theoretisch werden mit der in Kap. 4.2.1 ermittelten Massensensitivität für den 60  $\mu$ m Sensor größere Frequenzverschiebungen für die Nanopartikel erwartet, siehe Tab. 4.5. Die Frequenzverschiebung für Streptavidin ist nah am theoretisch erwarteten Wert.

Im Vergleich zu den Ergebnissen aus Abb. 4.12, in der das Dispensieren von denselben Nanopartikeln, jedoch ohne diese zu spülen, auf einen unbeschichteten Sensor eine Frequenzverschiebung von -150 kHz ergeben hat, ist die Frequenzverschiebung von -7,2 kHz wesentlich kleiner.

Eine Analyse im REM ergab, dass sich die Salze aus der Pufferlösung der Nanopartikel auf dem ungespülten Sensor abgesetzt haben. Der Sensor hier zeigt keine Rückstände auf der Sensoroberfläche, lediglich ein paar Partikel haben sich am Sensorrand abgesetzt. Das Spülen der Pufferlösung vom Sensor ist also notwendig, um Salzurückstände zu vermeiden und so eine Verfälschung der Masse zu unterbinden.

Tabelle 4.5: Übersicht über die resultierenden Frequenzverschiebungen von Streptavidin auf Biosensoren mit PEG-Biotin funktionalisierten Siliziumnitrid-Oberflächen.

Rezeptor	Biotin	Streptavidin
Analyt	Streptavidin	Biotin-Au-NP
Puffer	PBS	PBS
$c$ [ $\mu$ g/ml]	1000	500
$t_A$ [min]	20	20
$\Delta f_{th}$ [Hz]	-2660	-10000 bis -34000
$\Delta f_{exp}$ [Hz]	-2260	-7240

## Bindung von Streptavidin auf Sensoren mit und ohne Biotin

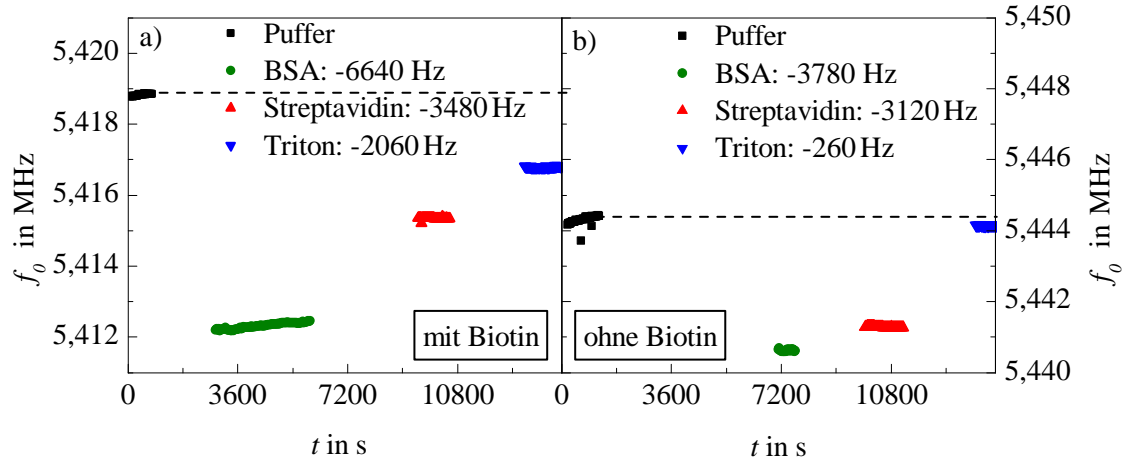


Abbildung 4.17: Experimentelle Ergebnisse der spezifischen Bindung von Streptavidin auf (a) Biosensoren mit Biotin und (b) Sensoren ohne Biotin. Bindung von Streptavidin (rot), Bindung von BSA (grün) und Entfernen der Proteine mit Triton (blau).

Als Zweites wird die spezifische Bindung von Streptavidin am Sensor mit und ohne Biotin untersucht. Das Protein BSA bindet nicht an den Rezeptor Biotin, wie in Kap. 2.3.4 beschrieben. Deshalb wird BSA vor Streptavidin auf den Biotin funktionalisierten Biosensor immobilisiert und die Resonanzfrequenzen werden in Abb. 4.17a aufgezeichnet. Das BSA setzt sich auf dem Biosensor ab und verschiebt die Frequenz um -6640 Hz, jedoch ist es nicht an das Biotin gebunden. Streptavidin bindet sich an Biotin und löst damit das BSA teilweise beim anschließenden Spülschritt. Die Differenz zur Nulllinie hat sich durch das Streptavidin auf -3480 Hz reduziert. Im Anschluss werden weitere nicht gebundene Analyte 20 min in Wasser mit 0,1 % Triton vom Biosensor gelöst. Letztendlich wurde die Frequenz um -2060 Hz durch gebundenes Streptavidin verschoben.

Dasselbe Experiment wird an einem Sensor ohne Biotin durchgeführt und die Resonanzfrequenzen werden in Abb. 4.17b aufgezeichnet. Die Frequenzverschiebungen sind qualitativ dieselben wie auf dem Biosensor mit Biotin. Die Analyte werden jedoch am Ende vollständig vom Triton gelöst.

Damit wurde gezeigt, dass das Streptavidin spezifisch an Biotin bindet und die nicht-gebundenen Analyte mit einem anschließenden Spülschritt durch das Triton entfernt werden können. Da sich die Analyte, besonders das BSA, aber auch ohne spezifische

Bindung an den Biosensor absetzen können und dadurch sichtbar die Frequenzen verschieben, wird im folgenden Abschnitt der Rezeptor mit PEG verlängert und ein weiterer Spülschritt mit PBS wird direkt nach der Immobilisation eingeführt. Die Salze im PBS reduzieren die Agglomeration und spülen die ungebundenen Analyte von der Sensoroberfläche.

### Biotin-PEG funktionalisierte Siliziumnitrid-Biosensoren

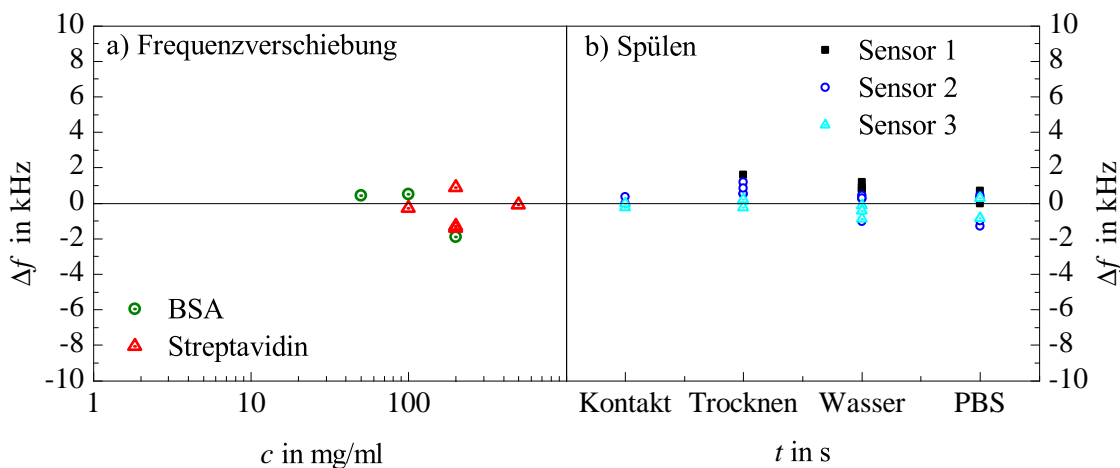


Abbildung 4.18: Experimentelle Ergebnisse der spezifischen Bindung von Streptavidin auf Biosensoren mit PEG-Biotin funktionalisierten Siliziumnitrid-Oberflächen. (a) Bindung von Streptavidin an Biotin (rot); keine Bindung von BSA an Biotin (grün). (b) Resultierende Frequenzverschiebung durch Spülschritte je Sensorchip: elektrisch Kontaktieren (D); 4x Trocknen (C,D); 3x mit gefiltertem DI Wasser spülen (B-D); 3x mit PBS und gefiltertem DI Wasser spülen (A-D).

Das Spülen und Trocknen des Biosensors wurde in den vorigen Abschnitten weiterentwickelt und besteht nun aus vier Schritten, die an Siliziumnitrid-Sensoren untersucht werden:

- A: Sensorchip 2 min in 1,5 ml PBS bewegen und abspülen,
- B: Sensorchip 2 min in 1,5 ml gefiltertem DI Wasser bewegen und abspülen,
- C: Sensorchip mit Pinzette entnehmen und 30 s unter Stickstofffluss trocknen,
- D: Sensor nach 2 min Pause elektrisch kontaktieren und die Messung wiederaufnehmen.

#### 4 Ergebnisse

Vor und zwischen den Schritten werden Resonanzfrequenzen der 60  $\mu\text{m}$  kleinen Sensoren bei elektrischen Spannungen von  $U_{\text{AC}} = 3\text{ V}$  und  $U_{\text{DC}} = 28\text{ V}$  gemessen. Die Frequenzen von  $U_{\text{AC}}$  werden in 50 Hz Schritten gefahren. Die Resonanzfrequenzen werden nach jedem Spülschritt gemessen und die Frequenzverschiebungen sind in Abb. 4.18b aufgezeichnet. Das Rekontaktieren (Schritt D) zeigt keine Frequenzverschiebungen. Das Trocknen unter Stickstofffluss (Schritt C, D) zeigt Verschiebungen von -250 Hz bis +1600 Hz. Das Spülen mit gefiltertem Wasser und anschließendem Trocknen (Schritte B, C, D) erzeugt Frequenzverschiebungen von -1300 Hz bis +1200 Hz um die Nulllinie. Dasselbe gilt auch, wenn der Sensor mit PBS gespült wird (Schritte A, B, C, D).

Damit wurde gezeigt, dass das Rekontaktieren des Sensors einen vernachlässigbar kleinen Einfluss auf die Resonanzfrequenzen hat. Das Spülen und das Trocknen wurden so weit optimiert, dass sich die Resonanzfrequenzen um weniger als 2 kHz verschieben (Abb. 4.18b). Dies ist leider auch die Größenordnung der nachzuweisenden Biomoleküle, die in Abb. 4.18a gezeigt und nun beschrieben werden.

Die Analyte werden aus einer Stammlösung von 1000  $\mu\text{g/ml}$  verdünnt zu 50  $\mu\text{g/ml}$ , 100  $\mu\text{g/ml}$ , 200  $\mu\text{g/ml}$  und 500  $\mu\text{g/ml}$ .

Vor dem ersten Messen der Resonanzfrequenz werden die Biotin-PEG funktionalisierten Sensoren wie oben beschrieben gespült (Schritte A-D). Nach 20 min Immobilisation in 100  $\mu\text{l}$  Pufferlösung ohne Analyt wird der Sensor gespült und getrocknet und seine Resonanzfrequenz wird gemessen, die jeweils die Nulllinie für die Sensoren ergibt. Nach anschließender Immobilisation in 100  $\mu\text{l}$  Pufferlösungen mit Analyten werden die Resonanzfrequenzen wieder gemessen und die Frequenzverschiebungen zur Nulllinie in Tab. 4.6 und in Abb. 4.18a aufgezeichnet. Jeder Datenpunkt ist ein Experiment an jeweils einem Sensor. Bei einer Konzentration von 200  $\mu\text{g/ml}$  verschiebt sich die Frequenz um -1400 Hz. Dieses Ergebnis konnte in zwei von vier Fällen an weiteren Sensorchips wiederholt werden. Kleinere Konzentrationen verschieben die Resonanzfrequenz um weniger als 500 Hz.

Im Vergleich dazu zeigen die negativen Proben mit dem nicht an Biotin bindenden Analyten BSA (grüne Marker) keine Frequenzverschiebungen und bleiben auf der Nulllinie.

Das Streptavidin bindet teilweise an das PEG-Biotin: In drei von sieben Fällen wurde die spezifische Bindung auf dem Biosensor erfolgreich gezeigt. Kleinere Konzentrationen ergaben kein erfolgreiches Ergebnis. Dies kann unter anderem am Spül-

prozess liegen, wie in Abb. 4.18b gezeigt wurde. Sobald der Sensor in Kontakt mit Wasser kommt, verschieben sich die Resonanzfrequenzen statistisch gesehen in derselben Größenordnung wie die zu detektierende Frequenzverschiebung.

Der Nachweis der spezifischen Bindung wurde hier mit BSA in zwei Fällen erfolgreich getestet. Allgemein wird das Schlüssel-Schloss-Prinzip von Streptavidin an Biotin in der SPR auf Goldsensoren erfolgreich verwendet, wie in Kap. 2 beschrieben. Deshalb werden die Spülprozesse und die spezifische Bindung ebenfalls an Gold-Biosensoren untersucht und mit den Ergebnissen der Siliziumnitrid-Biosensoren verglichen.

Tabelle 4.6: Übersicht über die resultierenden Frequenzverschiebungen von Streptavidin auf Biosensoren mit PEG-Biotin funktionalisierten Siliziumnitrid-Oberflächen.

	Reproduktion	negative Probe
Rezeptor	Biotin	Biotin
Analyt	Streptavidin	BSA
Puffer	PBS 0,05 %	Tween20
$c$ [ $\mu\text{g/ml}$ ]	50 bis 200	100 bis 500
$t_A$ [min]	20	20
$\Delta f$ [Hz]	900	-1900
	-10500	450
	-1400	500
	-1300	
	-100	
	-300	

### Biotin-PEG funktionalisierte Gold-Biosensoren

Die Siliziumnitrid-Sensoren sind zu 90 % mit Gold beschichtet und mit PEG-Biotin funktionalisiert, wie in Kap. 3.3 und 2.3 beschrieben ist.

Die Messungen aus Abb. 4.18a werden an diesen Gold-Biosensoren wiederholt. Zusätzlich werden neben Streptavidin auch Streptavidin-funktionalisierte Nanopartikel mit 5 nm Durchmesser getestet. Die Analytenkonzentration  $c$  variiert dabei für Streptavidin zwischen 20  $\mu\text{g/ml}$ , 50  $\mu\text{g/ml}$ , 100  $\mu\text{g/ml}$ , 200  $\mu\text{g/ml}$  und 500  $\mu\text{g/ml}$  und für Streptavidin-Gold-Nanopartikel zwischen 10  $\mu\text{g/ml}$ , 20  $\mu\text{g/ml}$ , 40  $\mu\text{g/ml}$  und 80  $\mu\text{g/ml}$ .

Die resultierenden Frequenzverschiebungen sind in Abhängigkeit von der Konzentration in Tab. 4.7 und in Abb. 4.19a aufgezeichnet. Im Vergleich zu den Ergebnissen

#### 4 Ergebnisse

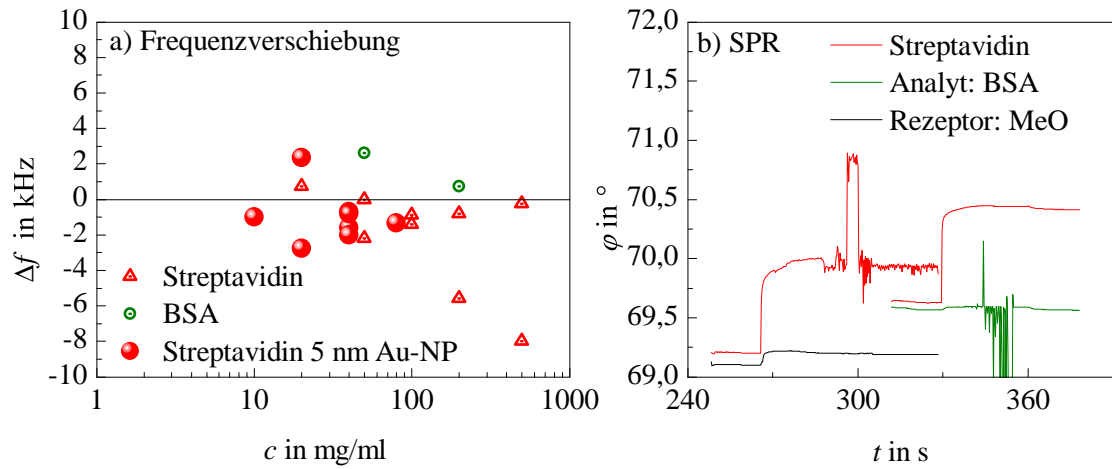


Abbildung 4.19: Experimentelle Ergebnisse der spezifischen Bindung von Streptavidin auf Biosensoren mit PEG-Biotin funktionalisierten Gold-Oberflächen. (a) Resultierende Frequenzverschiebungen durch Streptavidin (rote Marker), mit Gold-Nanopartikeln funktionalisiertem Streptavidin (rote kugelförmige Marker) bzw. BSA (grüne Marker). (b) Nachweis der spezifischen Bindung auf SPR-Goldsensoren. Bindung von Streptavidin an Biotin (rot); keine Bindung von Streptavidin an anderem Rezeptor (schwarz); keine Bindung von BSA an Biotin (grün).

auf dem Siliziumnitrid-Biosensor in Abb. 4.18a zeigen die Frequenzverschiebungen deutlich mehr Datenpunkte. Das Streptavidin (rote Marker) zeigt in drei Fällen Frequenzverschiebungen: Bei  $50 \mu\text{g/ml}$  um  $-2200 \text{ Hz}$ , bei  $200 \mu\text{g/ml}$  um  $-5600 \text{ Hz}$  und bei  $500 \mu\text{g/ml}$  um  $-8000 \text{ Hz}$ . Wiederholungen bei diesen Konzentrationen zeigen, ebenso wie bei den Siliziumnitrid-Biosensoren, nahezu keine Frequenzverschiebung.

Die funktionalisierten Nanopartikel zeigen Frequenzverschiebungen von  $-1350 \text{ Hz}$  bei  $80 \mu\text{g/ml}$  bis zu  $-2750 \text{ Hz}$  bei  $20 \mu\text{g/ml}$ . Sowohl die Streptavidin funktionalisierten Nanopartikel als auch das Streptavidin zeigen eine Abhängigkeit von der Konzentration.

Das BSA zeigt auf den Gold-Biosensoren Verschiebungen um  $750 \text{ Hz}$  und  $2600 \text{ Hz}$  nach oben, statt an der Nulllinie zu bleiben, weshalb die spezifische Bindung an SPR-Sensoren untersucht werden muss.

Die SPR-Sensoren bestehen aus unstrukturierten Glassubstraten, die mit einem dünnen Haftlayer aus Chrom und  $50 \text{ nm}$  Gold beschichtet sind. Parallel zum Nachweis der Bindung von Streptavidin an PEG-Biotin, wird jeweils ein SPR-Sensor mit dem

Rezeptor MeO statt Biotin funktionalisiert und ein SPR-Sensor mit dem Analyten BSA statt Streptavidin immobilisiert. An MeO bindet Streptavidin nicht und BSA bindet nicht an Biotin. Nach etwa 25 min Immobilisation von Analyt an Rezeptor werden die SPR-Sensoren mit PBS und Wasser gespült. Der Reflektionswinkel  $\varphi$  wird währenddessen durchgehend gemessen und ist in Abb. 4.19b aufgetragen. Es ist qualitativ zu sehen, dass sich der Winkel für Streptavidin auf Biotin (rot) in beiden Fällen deutlich verändert hat, während die Winkel für die negativen Proben, also Streptavidin auf dem anderen Rezeptor (schwarz) und BSA auf Biotin (grün), sich nicht bzw. geringfügig verändert haben. Dies ist der qualitative Nachweis, dass die spezifische Bindung von Streptavidin auf die eigens funktionalisierte Gold-Oberfläche des Biosensors funktioniert.

Tabelle 4.7: Übersicht über die resultierenden Frequenzverschiebungen von Streptavidin auf Biosensoren mit PEG-Biotin funktionalisierten Gold-Oberflächen.

	Reproduktion		negative Probe
Rezeptor	Biotin	Biotin	Biotin
Analyt	Streptavidin	Au-NP	BSA
Puffer	PBS 0,05 % Tween20		
$c$ [ $\mu\text{g/ml}$ ]	200 bis 500	10 bis 80	50 bis 200
$t_A$ [min]	20	20	20
$\Delta f$ [Hz]	-2200	-2750	750
	-8000	-2000	2600
	-5600	-1350	
	-800	-1600	
	750	2350	
	0	-1000	
	-250		

### 4.3.2 Charakterisierung mit Biomarkern auf GM1

In diesem Abschnitt werden die spezifischen Bindungen von ctxB und Anti-G<sub>M1</sub> an G<sub>M1</sub> funktionalisierten Biosensoren untersucht. Dabei werden die Experimente durchgeführt, wie für den Nachweis mit Streptavidin auf Siliziumnitrid-Biosensor (Abb. 4.18a). Die Experimente unterscheiden sich dabei in

- Rezeptor: G<sub>M1</sub> statt Biotin,



#### 4 Ergebnisse

- Analyte, die an den Rezeptor binden: ctxB und Anti- $G_{M1}$ ,
- Adhäsionszeit: von 20 min auf 15 min reduziert,
- negative Proben: BSA bindet nicht an  $G_{M1}$ ; ctxB bindet nicht an Biotin,
- keine Variation der Konzentration,
- Hinzugabe von 1 % BSA in die Pufferlösung.

Die Resonanzfrequenzen werden gemessen und in Tab. 4.8 und Abb. 4.20 aufgezeichnet. Die Bindung von ctxB (Abb. 4.20a) und Anti- $G_{M1}$  (Abb. 4.20c) an  $G_{M1}$  zeigen Frequenzverschiebungen von -1950 Hz bzw. -7900 Hz. Die Wiederholungen mit drei

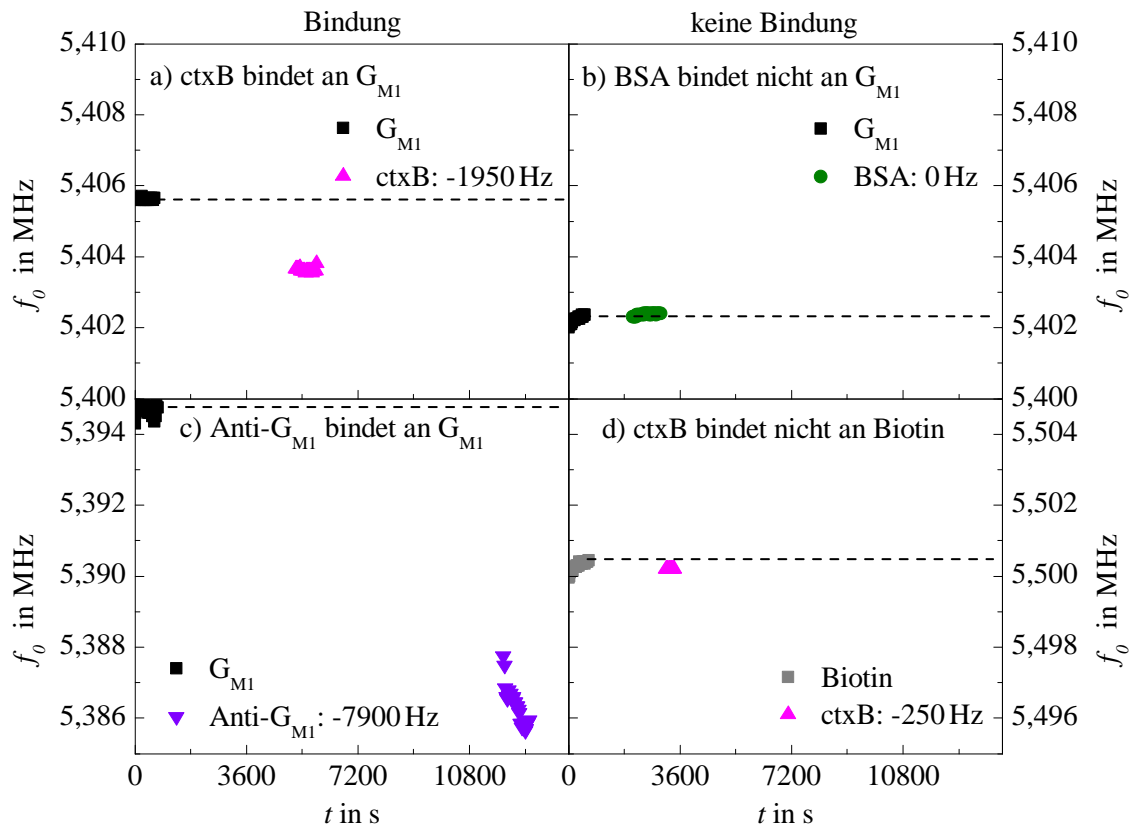


Abbildung 4.20: Experimentelle Ergebnisse der spezifischen Bindung von ctxB und Anti- $G_{M1}$  auf Biosensoren mit  $G_{M1}$  funktionalisierten Siliziumnitrid-Oberflächen. Bindung der Analyte (a) ctxB und (c) Anti- $G_{M1}$  an den Rezeptor  $G_{M1}$ . (b) Keine Bindung des Proteins BSA an den Rezeptor  $G_{M1}$ . (d) Keine Bindung des Analyts ctxB an Biotin.

mit  $G_{M1}$  funktionalisierten Sensoren zeigen, dass sich die Frequenzen zwar in dieselbe Richtung verschieben, jedoch nicht mit demselben Betrag.

Im Vergleich dazu zeigen BSA an  $G_{M1}$  (0 Hz) und ctxB an Biotin (-250 Hz) wie gewünscht keine bzw. eine vernachlässigbar kleine Bindung.

Tabelle 4.8: Übersicht über die resultierenden Frequenzverschiebungen von ctxB und Anti- $G_{M1}$  auf Biosensoren mit  $G_{M1}$  funktionalisierten Siliziumnitrid-Oberflächen.

	Bindung		keine Bindung	
Rezeptor	$G_{M1}$	$G_{M1}$	$G_{M1}$	Biotin
Analyt	ctxB	Anti- $G_{M1}$	BSA	ctxB
Puffer	PBS	0,1 % BSA	0,05 % Tween20	
$c$ [ $\mu\text{g/ml}$ ]	20			
$t_A$ [min]	15	15	15	15
$\Delta f$ [Hz]	-2000	-7900	0	-200
	-1200		350	
	-3800			

## Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurde das biologische Ereignis mit Proteinen und Biomarkern auf dem Biosensor untersucht. Die spezifische Bindung von Streptavidin an Biotin, ctxB an  $G_{M1}$  und dem Antikörper Anti- $G_{M1}$  an  $G_{M1}$  wurde auf den Biosensoren nachgewiesen. Es wurde gezeigt, dass das biologische Ereignis qualitativ möglich ist und die Rezeptoren auf dem Biosensor selektiv die Analyte binden. Die Analyte setzen sich auch unspezifisch an den Sensor ab und konnten mit Triton im Wasserbad gelöst werden. Die Agglomerationen und unspezifischen Bindungen wurden deshalb durch Verlängerung der Rezeptoren mit PEG und Einsatz von PBS im Spülprozess reduziert.

## 4.4 Integration des Sensorprinzips

In diesem Kapitel werden erste Ergebnisse über die Integrationen der ROIC, der Mikrofluidik und der programmierbaren Fluidik in das System erläutert.

### 4.4.1 CMOS-integrierte Ausleseschaltung

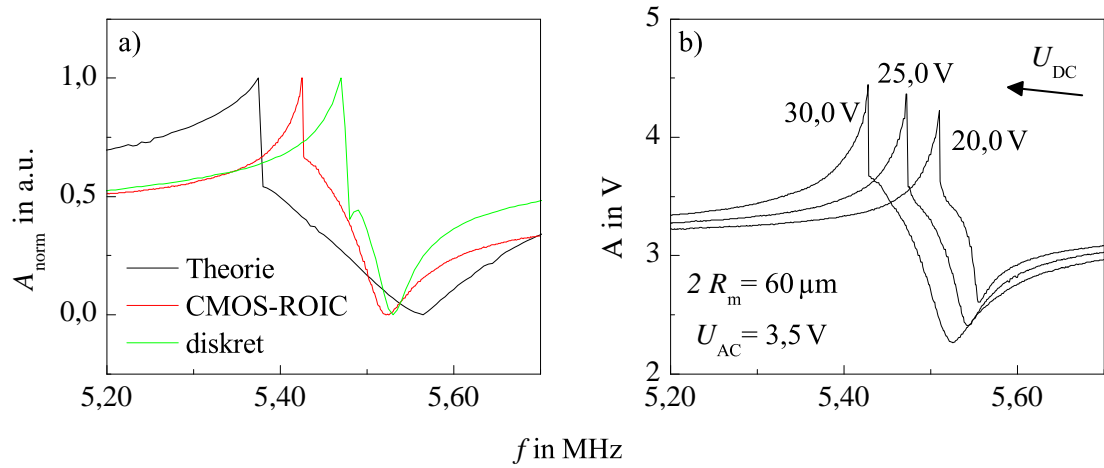


Abbildung 4.21: Experimentelle Ergebnisse des Sensors mit integrierter Ausleseschaltung (ROIC). (a) Vergleich der normierten Amplitude von Sensoren, die mit CMOS-ROIC bzw. diskreter Ausleseschaltung gemessen wurden und der mit LPM simulierten Amplitude. (b) Elektrische Amplitude eines Sensors mit  $60 \mu\text{m}$  Durchmesser und ROIC in Abhängigkeit von der Biasspannung bei  $U_{\text{AC}} = 3,5 \text{ V}$ .

Die diskrete Ausleseschaltung, also der Lock-in Verstärker, der für die biologischen Experimente verwendet wurde, wird ersetzt durch CMOS-ROIC, wie in Kap. 3.5 beschrieben ist. Die elektrische Amplitude wird bei  $U_{\text{AC}} = 3,5 \text{ V}$  zu unterschiedlichen Biasspannungen von 20,0V, 25,0V und 30,0V gemessen (Abb. 4.21b). Durch den Spring Softening wird die Resonanz mit steigender Biasspannung von 5,5 MHz zu 5,4 MHz verschoben.

Die normierten Amplituden des CMOS-ROIC Sensors (Abb. 4.15), des diskreten Sensors (Abb. 4.16) und einer numerischen LPM-Simulation (Abb. 4.2f) sind in Abb. 4.21 aufgetragen. Der Amplitudensprung durch den nichtlinearen Effekt im anharmonischen Bereich ist in allen drei Kurven zu erkennen. Auch zeigt die Amplitude nach der Resonanz die Form des BvD-Modells. Abweichungen der Resonanzfrequenzen entstehen durch die unterschiedlichen elektrischen Spannungen.

Damit wurde gezeigt, dass die Integration der Ausleseschaltung auf den Sensorchip einen messbaren Amplitudensprung zeigt und, wie für den diskreten Sensor auch (s. Abb. 4.2), die Resonanzfrequenz durch die Biasspannung beeinflusst werden kann. Dementsprechend kann das System auf die Signalelektronik und den Sensorchip reduziert werden und schafft so Platz für weitere Elemente, wie die programmierbare Fluidik, die im nächsten Abschnitt beschrieben ist.

#### 4.4.2 Integration einer programmierbaren Fluidik

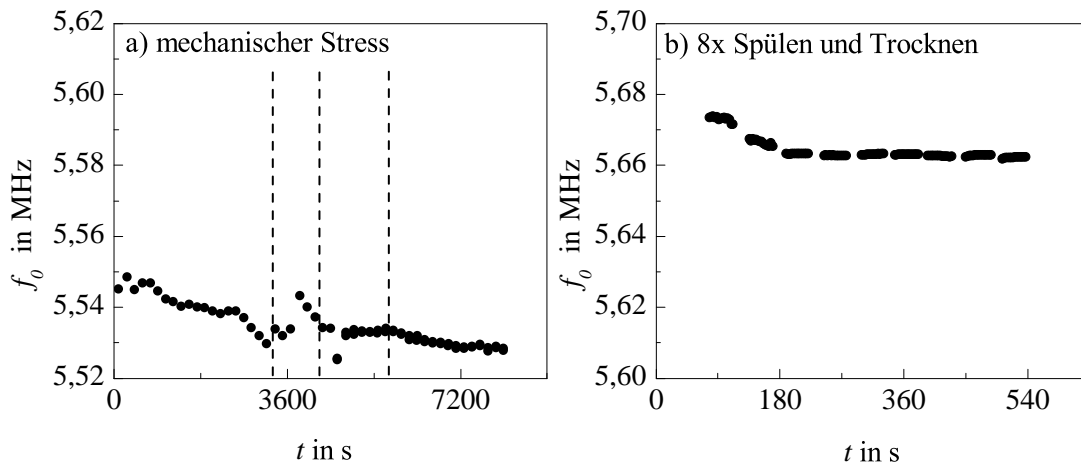


Abbildung 4.22: Experimentelle Ergebnisse des Sensors mit integrierter Ausleseschaltung (ROIC) zur Integration in die Fluidik. Resonanzfrequenzen bei Ausübung von (a) mechanischem Stress auf die Platine und (b) Spülen und Trocknen der eingebetteten Platine.

Für die Integration einer Mikrofluidik wurde ein Gehäuse entwickelt, das den montierten Sensorchip wasserdicht umschließt, wie in Kap. 3.5 beschrieben ist. Deshalb wird auf den äußeren Rand der Platine ein mechanischer Stress ausgeübt und die Resonanzfrequenz des Sensors mit CMOS-ROIC aufgezeichnet (Abb. 4.22a). Ab  $t = 4400$  s wird die Platine fixiert und wiederholt mechanisch Stress ausgeübt. Die Resonanzfrequenz verschiebt sich ohne Fixierung durch den mechanischen Stress um 20 kHz. Wenn die Platine fixiert ist, verschiebt der mechanische Stress die Resonanzfrequenz um weniger als 1 kHz und ist vernachlässigbar klein. Der mechanische Stress, der durch das wasserdichte Verschließen des Gehäuses auf die Platine ausgeübt wird, hat also einen vernachlässigbar kleinen Einfluss auf die Resonanzfrequenzen.

## 4 Ergebnisse

Als nächstes wird ein Sensor mit CMOS-ROIC auf der längeren Platine montiert und vom Gehäuse wasserdicht umschlossen. Destilliertes Wasser wird über dem Sensorchip injiziert, das den Sensor umspült und nach unten durch eine kleine Öffnung der Platine austritt. Getrocknet wird der Sensor über Stickstofffluss, der ebenso unmittelbar nach dem Wasser über dem Sensorchip injiziert wird. Nach jedem Spülen und Trocknen des Sensors mit der Fluidik wird die Resonanzfrequenz in Abb. 4.22 aufgetragen. In den ersten beiden Fällen verschiebt sich die Resonanzfrequenz um -10 kHz. Anschließend bleibt die Resonanzfrequenz bei 5,62 MHz stabil.

Damit wurde ein CMOS-ROIC Sensor in ein System mit programmierbarer Fluidik integriert. Die ersten zwei bis drei Spülschritte verschieben die Resonanzfrequenz, bis anschließend die Frequenz ein stabiles Signal zeigt. Die Fluidik und die Messung der Resonanzfrequenz werden über das Messprogramm gesteuert. Dabei werden die Fließgeschwindigkeiten und Volumina im Milliliter- und Mikroliterbereich über die Syringe-Pumpen eingestellt.

### 4.4.3 Integration einer Mikrofluidik

Die Fluidik aus dem vorigen Abschnitt wird auf eine Mikrofluidik reduziert. Dafür wurde ein Prototyp aus PDMS entwickelt, der auf einem Glassubstrat gebondet ist, wie in Kap. 3.5 beschrieben ist.

Die Mikrofluidik besteht aus einer Öffnung zum Einfüllen der Flüssigkeit, einem Reaktionskanal, einem Fließwiderstand in Mäanderform, einer Kapillarpumpe und einer Austrittsöffnung am Ende der Kapillarpumpe (s. Abb. 3.23). Diese Funktion der Elemente wird mit Isopropanol und mit einem Gemisch aus Isopropanol und Wasser getestet.

In die Einfüllöffnung wird Flüssigkeit pipettiert und das Fließen beobachtet. Die Reaktionskammer wird tropfenförmig und nicht vollständig gefüllt. Durch den Widerstand fließt Flüssigkeit, aber Produktionsfehler, Lufteinschlüsse und die rechteckigen Winkel beeinträchtigen das Fließen negativ. Deshalb wird auf den Widerstand und auf einen verbreiterten Reaktionskanal verzichtet. Aber der Tropfen tritt nicht in die Kapillarpumpe ein, deshalb wird die Pumpe für den Funktionstest durch die Austrittsöffnung befüllt. Die kapillaren Kräfte zwischen den Strukturen innerhalb der Pumpe ziehen die Flüssigkeit erfolgreich durch die Pumpe. Eine Analyse an der Universität Nijmegen stellte heraus, dass der Abstand der ersten Struktur zum Kanal zu groß war, um die Flüssigkeit aus dem Kanal in die Pumpe zu ziehen.

Für den zweiten Prototypen wurde an der Universität Nijmegen die Kanalhöhe von 100  $\mu\text{m}$  auf 50  $\mu\text{m}$  reduziert und die Kanalbreite konstant von der Einfüllöffnung bis

zur Pumpe auf 100  $\mu\text{m}$  Breite gehalten. Erste Funktionstests von der Mikrofluidik auf einem Glassubstrat waren erfolgreich. Die Fließgeschwindigkeit ist dabei klein genug, um den Tropfen ausreichend lange über dem Sensor verweilen zu lassen, damit sich die Proteine in dem Tropfen an die funktionalisierte Oberfläche binden können.

Ein dritter Prototyp wurde für den montierten Sensor entwickelt. Die nächsten Schritte sind, die Mikrofluidik auf den Sensor zu montieren und die Resonanzfrequenz mit Spülen und Trocknen zu messen, wie es für die programmierbare Fluidik im vorigen Abschnitt gezeigt wurde.

### **Zusammenfassung**

Das Messsystem wurde durch Integration der Ausleseschaltung miniaturisiert und durch Integration der Fluidik automatisiert. Die elektrische Amplitude des Sensors mit CMOS-ROIC zeigt im Vergleich zur Theorie eine ähnliche Form und, wie der diskrete Sensor auch, eine Verschiebung der Resonanzfrequenz durch die Biasspannung.

Der Sensor mit ROIC wird in ein Fluidiksystem integriert und seine Resonanzfrequenzen wurden mit einem Spülprozess getestet. Das System nimmt die Messung der Resonanzfrequenz selbstständig wieder auf. Die ersten zwei bis drei Spülprozesse verschieben die Resonanzfrequenz um 20 kHz und anschließend bleibt die Frequenz stabil.

Der erste Prototyp der Mikrofluidik konnte teilweise erfolgreich auf einem Glassubstrat getestet werden. Die Strukturen der Kapillarpumpe wurden nach Zimmermann et al. [70] strukturiert und erfolgreich mit Isopropanol getestet. Die erste Struktur muss jedoch nahe genug am Reaktionskanal liegen, um die Flüssigkeit aus dem Kanal in die Pumpe zu ziehen. In weiterführenden Entwicklungen der Mikrofluidik an der Universität Nijmegen wurden die Mikrofluidik vereinfacht, die Strukturen in der Kapillarpumpe variiert und die Kanalhöhe auf 50  $\mu\text{m}$  reduziert. Nach dem Montieren auf den Sensorchip wird die Mikrofluidik in das Messsystem integriert.

Nach erfolgreicher Integration der Fluidik bzw. der Mikrofluidik in das Messsystem sollen Nanopartikel und Mikrokugeln injiziert und die Frequenzverschiebung automatisch gemessen werden.

## 5 Diskussion und Ausblick

In dieser Arbeit wurde ein kapazitiver Drucksensor auf sein Resonanzverhalten und sein Auflösungsvermögen charakterisiert. Dafür wurde ein Messsystem entwickelt, das den Sensor elektrostatisch zur Resonanz anregt und die Resonanzfrequenz elektrisch misst. Das Auflösungsvermögen des Sensors wurde mit Variation der elektrischen Spannungen optimiert und mit dünnen Goldschichten und Partikeln bestimmt. Zusätzlich wurde der Sensor biochemisch beschichtet und auf seine Selektivität untersucht. Dazu gehört der Nachweis der spezifischen Bindung mit Proteinen und Biomarkern auf dem Sensor.

Das Messsystem wurde durch Integration der Ausleseschaltung miniaturisiert und durch Integration der Fluidik automatisiert. Hierfür wurde die Ausleseschaltung auf den Sensorchip integriert und das Resonanzverhalten wurde mit dem des diskreten Sensors verglichen.

Eine vollautomatische und programmierbare Fluidik wurde für die Messsequenz von Messen - Spülen - Trocknen - Messen entwickelt. Der Sensor mit integrierter Ausleseelektronik wurde in die Fluidik integriert und im Spülprozess getestet. Zusätzlich wurde eine Mikrofluidik mit Kapillarpumpe für den Sensor entwickelt, um das Probenvolumen zu reduzieren und das gesamte Messsystem zu miniaturisieren.

### **Charakterisierung des massensensitiven Sensors**

Das Resonanzverhalten des Sensors wurde charakterisiert und sein Auflösungsvermögen untersucht.

Der elektrostatische Spring-Softening Effekt bewirkt, dass sich die Resonanzfrequenz

mit steigender Biasspannung zu kleineren Frequenzen verschiebt und dass die Amplitude mit dem Quadrat der Biasspannung steigt. Die Resonanzfrequenz und die Amplitude können also durch die Biasspannung angepasst werden. Dabei gilt, je größer die Biasspannung, desto größer und stabiler der Sprung.

Durch das Anpassen der elektrischen Spannungen und durch Verwendung kleinerer Frequenzschritte wurde die Stabilität der Resonanzfrequenz von einer maximalen Abweichung von  $3\sigma = 500$  Hz reduziert auf  $3\sigma = 60$  Hz. Die Resonanzfrequenz ist damit ausreichend stabil, um Frequenzverschiebungen von -2300 Hz mit Streptavidin nachzuweisen.

Tabelle 5.1: Massensensitivitäten von Sensoren mit 60  $\mu\text{m}$ , 70  $\mu\text{m}$  und 96  $\mu\text{m}$  Durchmesser.

Analyt	Gold			Mikrokugeln
2 $R_m$ [ $\mu\text{m}$ ]	60	70	96	60
$U_{AC}$ [V]	1,5	1,0	0,5	4,0
$U_{DC}$ [V]	28,0	28,0	5,0	15,0
$\Omega_{0,\text{th}}$ [MHz]	5,5	4,1	2,2	5,5
$f_{0,\text{exp}}$ [MHz]	5,2	4,0	2,4	5,4
$S_{\text{th}}$ [Hz/pg]	337	178	75	337
$S_{\text{exp}}$ [Hz/pg]	344-506	234-266	23-570	530-590
$\Delta m_{\text{min}}$ [pg]			20	25

Der Sensor wurde mit definierten Goldschichten kalibriert, die im Postprozess abgeschieden wurden. Dazu wurde zu jeder Messung ein Sensorpaar, bestehend aus einem Sensor und einer Referenz, gemessen und die Differenz der Resonanzfrequenzen ermittelt. Die Dicke von 80 nm bis 100 nm wurde mit Weißlicht-Interferometrie gemessen. Tabelle 5.1 fasst die Ergebnisse der Massensensitivität  $S$ , der Resonanzfrequenz  $f_0$  und der verwendeten elektrischen Spannungen  $U_{AC}$  und  $U_{DC}$  zusammen. Die theoretische Eigenfrequenz  $\Omega_0$  und die theoretische Sensitivität  $S_{\text{th}}$  werden aus dem Kehrwert der effektiven Masse des Sensors ermittelt. Ein kleiner Sensor mit kleinem Radius und deshalb auch geringer Masse besitzt entsprechend eine hohe Resonanzfrequenz und eine hohe Sensitivität. Die Abhängigkeit der Sensitivität und der Resonanzfrequenz vom Sensordurchmesser wurde mit FEM-Simulationen gezeigt und genauere Werte wurden für unterschiedliche Massenverteilungen ermittelt. Die



## 5 Diskussion und Ausblick

gemessenen Resonanzfrequenzen  $f_{0,\text{exp}}$  und Sensitivitäten  $S_{\text{exp}}$  liegen, mit ein paar Ausnahmen für große Sensoren, im Bereich der FEM-Simulation.

Experimentell wurde ein Auflösungsvermögen von 20 pg Gold und 25 pg Mikrokugeln nachgewiesen. In der Literatur wurde eine Sensitivität von 12 Hz/pg eines Diaphragmas mit  $f_0 = 7,8$  MHz gemessen, das auf dieselbe Art mit Gold beschichtet wurde [18], während der Sensor in dieser Arbeit mit demselben Durchmesser eine Sensitivität von 340 Hz/pg bei  $f_0 = 5,2$  MHz erreicht.

Mit CdSe-Nanopartikeln wurde gezeigt, dass während der laufenden Messung eines Sensorpaares die Masse eines Sensors durch zielgenaues Pipettieren mit dem Nanodispenser variiert werden kann. Dabei bleibt die Frequenz des Referenzsensors gleich, während sich die Frequenz des anderen Sensors aufgrund der zusätzlichen Masse verschiebt. In diesem Fall hat sich die Frequenz durch 900 pg Nanopartikel um 150 kHz verschoben. Das ergibt eine Massensensitivität von 167 Hz/pg und liegt im unteren Bereich des theoretisch erwarteten Wertes von 120 Hz/pg bis 1000 Hz/pg. Mit Mikrokugeln in Isopropanol wurde gezeigt, dass die Frequenzverschiebung reproduzierbar ist und dass die Frequenz proportional zur hinzugefügten Masse sinkt. Dabei lösen oder verschieben sich die Mikrokugeln nicht durch die Oszillation des Sensors. Es wurden Massen von 25 pg beim ersten Pipettieren und 95 pg beim zweiten Pipettieren hinzugefügt. Das ergibt Massensensitivitäten von 530 Hz/pg und 590 Hz/pg, die im Bereich des theoretisch erwarteten Wertes von 220 Hz/pg bis 1200 Hz/pg liegen. Auf die gesamte Sensorfläche  $A$  ergibt das eine Massensensitivität von  $S^{-1}/A = 66,7$  pg/Hz/cm<sup>2</sup>. Park et al. hat Platin auf die Sensorfläche eines 0,5 µm dünnen CMUT aufgetragen und eine Sensitivität von nur 13,0 pg/Hz/cm<sup>2</sup> ermittelt, was bei einer Resonanzfrequenz von 18,2 MHz umgerechnet eine Sensitivität von 30300 Hz/pg ergibt [15]. Der CMUT besitzt, wie der Drucksensor in dieser Arbeit, eine runde dünne Sensormembran, deshalb ist die Massensensitivität vergleichbar. Weitere Massensensitivitäten pro Fläche sind im Vergleich zu anderen Sensoren in Tab. 5.2 aufgelistet.

### Entwicklung von Probenpräparation und Sensorbeschichtung

Der Sensor wurde zielgenau und kontaktlos mit dem Nanodispenser getroffen, jedoch machen die Eigenschaften der Kapillare den Dispenser empfindlich und somit wartungsintensiv. Agglomerationen und kleinste Luftbläschen verstopfen die Kapillare. Der Vergleich zwischen automatischem und manuellem Pipettieren zeigt, dass das Pipettieren mit dem Nanodispenser das gleichzeitige Messen und Pipettieren möglich macht, jedoch das Experiment sehr aufwändig ist und die Kapillare sehr

Tabelle 5.2: Massensensitivität pro Fläche von massensensitiven MEMS-Sensoren.

Sensor	Methode	$S^{-1}/A$ [pg/Hz/cm <sup>2</sup> ]	Quelle
CMUT	kapazitiv	13	[15]
FBAR	piezoelektrisch	3	[43]
Beam	piezoresistiv	0,3	[44]
Drucksensor	kapazitiv	66,7	diese Arbeit

empfindlich ist. Das manuelle Pipettieren wurde deshalb für die Experimente bevorzugt und auf die Anwendung des Biosensors optimiert.

Das biologische Ereignis wurde mit Proteinen und Biomarkern auf dem Biosensor untersucht. Die spezifische Bindung von Streptavidin an Biotin, ctxB an  $G_{M1}$  und dem Antikörper Anti- $G_{M1}$  an  $G_{M1}$  wurde auf den Biosensoren nachgewiesen. Es wurde gezeigt, dass das biologische Ereignis qualitativ möglich ist und die Rezeptoren auf dem Biosensor selektiv die Analyte binden. Die Analyte setzen sich auch unspezifisch an den Sensor ab, konnten jedoch mit einem Tensid im Wasserbad gelöst werden. Die Agglomerationen und unspezifischen Bindungen wurden deshalb durch Verlängerung der Rezeptoren mit PEG und Einsatz von PBS im Spülprozess reduziert. Die gemessenen Frequenzverschiebungen sind für Streptavidin an Biotin (Tab. 5.3) und die Biomarker an  $G_{M1}$  (Tab. 5.4) zusammengefasst. Aus der mit Mikrokugeln ermittelten Sensitivität ergibt sich, dass 4,26 pg auf dem Sensor gemessen wurden. In der Literatur wurden 0,313 pg Streptavidin-Gold-Nanopartikel auf einem mit Gold beschichteten Cantilever mit 0,33 Hz/pg Sensitivität gemessen [52].

Das biologische Ereignis und die spezifische Bindung wurden mit dem Analyt ctxB an  $G_{M1}$  in einer Konzentration von 20 µg/ml auf dem Siliziumnitrid-Sensor qualitativ nachgewiesen. In der Literatur werden Konzentrationen von 10 µg/ml bis 100 µg/ml für IgG Antikörpern auf goldbeschichteten Cantilevern untersucht. Es werden aber auch Konzentrationen um eine Größenordnung kleiner an Biosensoren untersucht [52].

Die Sensitivität kann durch die Orientierung der Antikörper mit geeigneter Immobilisierungstechnik um bis zu einem Faktor 800 erhöht werden [71]. Die spezifische Bindung der Biomoleküle wurde qualitativ auf dem Siliziumnitrid-Biosensor gezeigt. Um eine quantitative, reproduzierbare Aussage zu treffen, bedarf es weiterer Mes-

## 5 Diskussion und Ausblick

sungen. Dazu sind jedoch die biochemische Schicht und die spezifische Bindung der Analyte an die Schicht zu optimieren, was den Umfang dieser Arbeit übersteigen würde und Aufgabe der Projektpartner ist.

Tabelle 5.3: Übersicht über die resultierenden Frequenzverschiebungen von Streptavidin auf Biosensoren mit PEG-Biotin funktionalisierten Siliziumnitrid-Oberflächen.

Rezeptor	Biotin	Streptavidin
Analyt	Streptavidin	Biotin-Au-NP
Puffer	PBS	PBS
$c$ [ $\mu\text{g/ml}$ ]	1000	500
$t_A$ [min]	20	20
$\Delta f_{\text{th}}$ [Hz]	-2660	-10000 bis -34000
$\Delta f_{\text{exp}}$ [Hz]	-2260	-7240

Tabelle 5.4: Übersicht über die resultierenden Frequenzverschiebungen von ctxB und Anti- $G_{M1}$  auf Biosensoren mit  $G_{M1}$  funktionalisierten Siliziumnitrid-Oberflächen.

	Bindung		keine Bindung	
Rezeptor	$G_{M1}$	$G_{M1}$	$G_{M1}$	Biotin
Analyt	ctxB	Anti- $G_{M1}$	BSA	ctxB
Puffer	PBS	0,1 % BSA	0,05 % BSA	Tween20
$c$ [ $\mu\text{g/ml}$ ]	20			
$t_A$ [min]	15	15	15	15
$\Delta f$ [Hz]	-2000	-7900	0	-200
		-1200	350	
		-3800		

### Entwicklung des Messsystems mit Integrationen

Das Messsystem wurde durch Integration der Ausleseschaltung miniaturisiert und durch Integration der Fluidik automatisiert. Die elektrische Amplitude des Sensors mit CMOS-ROIC zeigt im Vergleich zur Theorie und dem diskreten Sensor eine ähnliche Form und, wie der diskrete Sensor auch, eine Verschiebung der Resonanzfrequenz durch die Biasspannung.

Der Sensor mit ROIC wurde in ein Fluidiksystem integriert und seine Resonanzfrequenzen wurden mit einem Spülprozess getestet. Das System nimmt die Messung der Resonanzfrequenz selbstständig wieder auf. Die ersten zwei bis drei Spülprozesse verschieben die Resonanzfrequenz um 20 kHz und anschließend bleibt die Frequenz stabil.

Der erste Prototyp der Mikrofluidik konnte teilweise erfolgreich auf einem Glassubstrat getestet werden. Die Strukturen der Kapillarpumpe wurden erfolgreich mit Isopropanol getestet. Die erste Struktur muss jedoch nahe genug am Reaktionskanal liegen, um die Flüssigkeit aus dem Kanal in die Pumpe zu ziehen. In weiterführenden Entwicklungen der Mikrofluidik an der Universität Nijmegen wurde die Mikrofluidik vereinfacht, die Strukturen in der Kapillarpumpe variiert und die Kanalhöhe auf 50  $\mu\text{m}$  reduziert. Nach dem Montieren auf den Sensorchip wurde die Mikrofluidik in das Messsystem integriert.

Nach erfolgreicher Integration der Fluidik bzw. der Mikrofluidik in das Messsystem sollen Nanopartikel und Mikrokugeln injiziert werden und die Frequenzverschiebung automatisch gemessen werden. Die integrierte Elektronik wurde zusammen mit dem Sensor hergestellt. Das spart Kosten, schränkt aber auch die Auswahl an Materialien ein. Die Oberfläche des Sensors besteht aus Siliziumnitrid. Die Elektroden haben eine chemisch instabile Aluminium-Oberfläche. Eine der Herausforderungen in dieser Arbeit war es, ein Sensorsystem zu entwickeln, das von der Größenordnung und der Selektivität Biomoleküle detektieren kann. Gleichzeitig durfte die Funktionalisierung der Oberfläche mit der biochemischen Schicht nicht die Elektronik und die Funktion beeinträchtigen [59]. Siliziumnitrid ist biokompatibel [60] und wird standardmäßig in MEMS-Sensoren verwendet. Ein Post-Prozess von chemisch stabilen und biokompatiblen Schichten wie Gold konnte dadurch vermieden werden, wodurch die Kosten in der Herstellung reduziert wurden.

## Ausblick

Die in dieser Arbeit vorgestellten Integrationen werden zu einem Gesamtsystem zusammengefügt, das beliebige Flüssigkeiten vollautomatisch dispensiert, abspült und die Masse elektrisch nachweist. Die Fluidik ermöglicht das Dispensieren von kleinen Volumina mit kontrollierbaren Fließgeschwindigkeiten, sodass zukünftige Messungen reproduzierbar wiederholt werden können. Aufgrund der wasserdichten Verschlüsselung und der austauschbaren Spritzen können die Flüssigkeiten individuell variiert und sicher über den Sensor dispensiert werden. Das ermöglicht sowohl verdünnte Partikel als auch Biomoleküle in unterschiedlichen Konzentrationen und Adhäsions-

## 5 Diskussion und Ausblick

zeiten zu untersuchen, ohne aufwändiges Hantieren des Sensorchips mit Pinzette und Pipette.

Als Demonstrator besitzt das gesamte System noch zu viel Equipment, aber auch das wird noch verkleinert und für eine bessere Performance optimiert. Den Anfang machte eine erfolgreiche Integration der Ausleseschaltung. Die elektrischen Spannungen wurden damit auf  $U_{AC} = 4\text{ V}$  und  $U_{DC} = 15\text{ V}$  reduziert und die Massensensitivität wurde mit Mikrokugeln untersucht.

Der Sensor wird biochemisch beschichtet und mit der Mikrofluidik und der CMOS-ROIC zu einem handlichen System miniaturisiert, sodass das Messsystem als kosteneffizientes Produkt einmalig angewendet wird. Dabei können sowohl Gaspartikel [15] als auch Biomoleküle wie Allergene [6] und Biomarker (diese Arbeit) nachgewiesen werden. Der Biosensor beruht dabei auf der Grundlage der Bindungsaffinität zwischen Biomolekül und Rezeptor der biochemischen Schicht. Die Sensitivität kann neben der Frequenzauflösung und Amplitudenstabilität auch durch die Immobilisierungstechnik [71] optimiert werden.

Die Funktionalisierung der Siliziumnitrid-Biosensoroberfläche ist noch neu und daher komplex und zeitaufwändig [40]. Eine Vereinfachung der biochemischen Beschichtung gibt die Möglichkeit, schneller und lokal die Sensoren zu beschichten, um Sensoren individuell zu funktionalisieren und so Referenzsensoren im System zu verwenden bzw. verschiedene Biomoleküle auf einem Array von Sensoren nachzuweisen [54].



# A Eigene Veröffentlichungen

## A.1 In Zusammenhang mit dieser Dissertation

A. Goehlich, C. Jonville, R. Klieber, X. Mao, **K. Martens**, T. Jansen, H. K. Trieu, H. Vogt: *A novel mass sensitive sensor*. Proceedings of Micro System Technologies 2011. International Conference & Exhibition on Micro-, Electro-Mechanical, Opto & Nano Systems, Darmstadt, 10.-12. October 2011, pp. 54-57.

**K. Burmester**, Y. Celik, R. Klieber, D. Greifendorf, N. Haas, A. Goehlich, H. Vogt: *Development of a Biosensor System for the Detection of Allergens and Biomarkers*. Poster presented at International Conference & Exhibition on MicroNanoConference 2012, Ede, NL, 10.-11. December 2012.

A. Goehlich, **K. Burmester**, Y. Celik, R. Klieber, D. Greifendorf, N. Haas, H. Vogt: *Development of an Universal Allergen Sensor System*. Proceedings of SENSOR 2013. AMA Conferences 2013 SENSOR, OPTO & IRS<sup>2</sup>. International Conference on Sensors and Measurement Technology and Exhibition SENSOR+TEST, Nürnberg, 14.-16. May 2013, pp. 540-545.

**K. Burmester**, A. Goehlich, Y. Celik, A. Schmidt, R. Klieber, N. Haas, D. Greifendorf, H. Vogt: *CMOS integrated free standing circular membrane for the detection of allergens and biomarkers*. Proceedings of Micro System Technologies 2013. International Conference & Exhibition on Micro-, Electro-Mechanical, Opto & Nano Systems, Aachen, 14.-16. October 2013, pp. 822-825.

**K. Burmester**, A. Goehlich, Y. Celik, A. Schmidt, R. Klieber, N. Haas, D. Greifendorf, H. Vogt: *CMOS integrierter massensensitiver Resonator zur Detektion von Allergenen und Biomarkern*. Poster presented at International Conference & Exhibition on Micro-, Electro-Mechanical, Opto & Nano Systems, Aachen, 14.-16. October 2013.

**K. Burmester**, A. Goehlich, Y. Celik, R. K. Manova, L. Scheres, E. Roeven, A. Trilling, A. Schmidt, U. Hutten, K. Neureiter, S. Pierrat, T. A. van Beek, H. Vogt: *CMOS integrierter Biosensor für die Detektion von Biomarkern*. Poster presented at 48th annual conference of the German Society for Biomedical Engineering, Hannover, 8.-10. October 2014.

## A.2 Weitere Veröffentlichungen

A. Wirthmann, X. Fan, Y. S. Gui, **K. Martens**, G. Williams, J. Dietrich, G. E. Bridges, C.-M. Hu: *Direct Phase Probing and Mapping via Spintronic Michelson Interferometry*. Physical Review Letters **105**, (2010), pp. 017202.

S. Mansfeld, J. Topp, **K. Martens**, J. N. Toedt, W. Hansen, D. Heitmann, S. Mendach: *Spin Wave Diffraction and Perfect Imaging of a Grating*. Physical Review Letters **108**, (2012), pp. 047204.



# Literaturverzeichnis

- [1] SCHÄFER, T. ; BÖHLER, E. ; RUHDORFER, S. ; WEIGL, L. ; WESSNER, D. ; HEINRICH, J. ; FILIPIAK, B. ; WICHMANN, H. E. ; RING, J.: Epidemiology of food allergy/food intolerance in adults: associations with other manifestations of atopy. In: *ALLERGY* 56 (2001), S. 1172–1179. – ISSN 0105–4538
  
- [2] SAMPSON, Hugh A.: Food allergy. Part 1: Immunopathogenesis and clinical disorders. In: *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 103 (1999), Nr. 5, S. 717–728. – ISSN 0091–6749
  
- [3] LEHRER, S. B. ; BANNON, G. A.: Risks of allergic reactions to biotech proteins in foods: perception and reality. In: *ALLERGY* 60 (2005), Nr. 5, S. 559–564. – ISSN 0105–4538
  
- [4] KIRSCH, Stéphanie ; FOURDRILIS, Séverine ; DOBSON, Rowan ; SCIPPO, Marie-Louise ; MAGHUIN-ROGISTER, Guy ; PAUW, Edwin d.: Quantitative methods for food allergens: a review. In: *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 395 (2009), Nr. 1, S. 57–67. . – DOI 10.1007/s00216–009–2869–7. – ISSN 1618–2642
  
- [5] VAN HENGEL, Arjon J.: Food allergen detection methods and the challenge to protect food-allergic consumers. In: *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 389 (2007), Nr. 1, S. 111–118. . – DOI 10.1007/s00216–007–1353–5. – ISSN 1618–2642
  
- [6] COSKUN, Ahmet F. ; WONG, Justin ; KHODADADI, Delaram ; NAGI, Richie ; TEY, Andrew ; OZCAN, Aydogan: A personalized food allergen testing platform on a cellphone. In: *Lab on a chip* 13 (2013), Nr. 4, S. 636. – ISSN 1473–0189

- [7] MORAN, Kari ; BURGNER, Christopher ; SHAW, Steven ; TURNER, Kimberly: A review of parametric resonance in microelectromechanical systems. In: *Nonlinear Theory and Its Applications, IEICE* 4 (2013), Nr. 3, S. 198–224
- [8] CAMPANELLA, Humberto: *Acoustic Wave and Electromechanical Resonators: Concept to Key Applications*. Norwood : Artech House, 2010. – ISBN 978–1–60783–977–4
- [9] YOUNIS, Mohammad I.: *MEMS Linear and Nonlinear Statics and Dynamics*. Springer, 2011 (Microsystems). – ISBN 9781441960207
- [10] GOEHLICH, Andreas ; TRIEU, Hoc K. ; KLIEBER, Robert ; JONVILLE, Carole: *SENSOR DEVICE AND METHOD: United States Patent Application 20120210794: US Patent No.: US 20120210794 A1*. 23.8.2012
- [11] DUDAICEVS, H. ; KANDLER, M. ; MANOLI, Y. ; MOKWA, W. ; SPIEGEL, E.: Surface micromachined pressure sensors with integrated CMOS read-out electronics. In: *Sensors and Actuators A: Physical* 43 (1994), Nr. 1–3, S. 157–163. – ISSN 0924–4247
- [12] KASTEN, Klaus ; KORDAS, Norbert ; KAPPERT, Holger ; MOKWA, Wilfried: Capacitive pressure sensor with monolithically integrated CMOS readout circuit for high temperature applications. In: *Sensors and Actuators A: Physical* 97–98 (2002), Nr. 0, S. 83–87. – ISSN 0924–4247
- [13] GOEHLICH, Andreas ; JONVILLE, Carole ; KLIEBER, Robert ; MAO, Xin ; MARTENS, Kim ; JANSEN, Timo ; TRIEU, Hoc K. ; VOGT, Holger: A novel mass sensitive sensor. In: VDI/VDE-IT (Hrsg.): *MikroSystemTechnik Kongress 2011*. Berlin : VDE-Verlag, 2011. – ISBN 978–3–8007–3367–5, S. 54–57
- [14] RHOADS, Jeffrey F. ; SHAW, Steven W. ; TURNER, Kimberly L. ; MOEHLIS, Jeff ; DEMARTINI, Barry E. ; ZHANG, Wenhua: Generalized parametric resonance in electrostatically actuated microelectromechanical oscillators. In: *Journal of Sound and Vibration* 296 (2006), Nr. 4–5, S. 797–829. – ISSN 0022–460X
- [15] PARK, Kwan K. ; LEE, Hyunjoo ; KUPNIK, Mario ; ORALKAN, Ömer ; RAMSEYER, Jean-Pierre ; LANG, Hans P. ; HEGNER, Martin ; GERBER, Christoph ; KHURI-YAKUB, Butrus T.: Capacitive micromachined ultrasonic transducer (CMUT) as a chemical sensor for DMMP detection. In: *Sensors and Actuators B: Chemical* 160 (2011), Nr. 1, S. 1120–1127. – ISSN 0925–4005

- [16] WAH, Thein: Vibration of Circular Plates. In: *The Journal of the Acoustical Society of America* 34 (1962), Nr. 3, S. 275. . – DOI 10.1121/1.1928110. – ISSN 00014966
- [17] PARK, Kwan K. ; LEE, Hyunjoo ; YARALIOGLU, G G. ; ERGUN, A S. ; ORALKAN, Ömer ; KUPNIK, M ; QUATE, C F. ; KHURI-YAKUB, Butrus T. ; BRAUN, T ; RAMSEYER, Jean-Pierre ; LANG, Hans P. ; HEGNER, Martin ; GERBER, Christoph ; GIMZEWSKI, J K.: Capacitive micromachined ultrasonic transducers for chemical detection in nitrogen. In: *Applied Physics Letters* 91 (2007), Nr. 9, S. 094102
- [18] HU, Zhongxu ; HEDLEY, John ; KEEGAN, Neil ; SPOORS, Julia ; WAUGH, William ; GALLACHER, Barry ; BOILLOT, François-Xavier ; COLLET, Joël ; MCNEIL, Calum: Design, fabrication and characterization of a piezoelectric MEMS diaphragm resonator mass sensor. In: *Journal of Micromechanics and Microengineering* 23 (2013), Nr. 12, S. 125019. – ISSN 0960–1317
- [19] GOEHLICH, Andreas ; BURMESTER, Kim ; CELIK, Yusuf ; KLIEBER, Robert ; GREIFENDORF, Dieter ; HAAS, Norbert ; VOGT, Holger: Development of an Universal Allergen Sensor System. In: *AMA Conferences 2013 mit SENSOR, OPTO & IRS*. Wunstorf : AMA Service GmbH, 2013. – ISBN 3981348435, S. 540–545
- [20] LANDAU, Lev D. ; LIFSHITZ, E. M. ; SYKES, J. B. ; BELL, J. S.: *Mechanics: Course of theoretical physics*. 3rd ed. Oxford and New York and Toronto : Pergamon press, 1976. – ISBN 0080210228 9780080210223
- [21] LADABAUM, I. ; XUECHENG JIN ; SOH, H. T. ; ATALAR, A. ; KHURI-YAKUB, B. T.: Surface micromachined capacitive ultrasonic transducers. In: *Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control, IEEE Transactions on* 45 (1998), Nr. 3, S. 678–690. – ISSN 0885–3010
- [22] BANNON, F. D. ; CLARK, J. R. ; NGUYEN, C.T.-C.: High-Q HF microelectromechanical filters. In: *IEEE Journal of Solid-State Circuits* 35 (2000), Nr. 4, S. 512–526. . – DOI 10.1109/4.839911. – ISSN 0018–9200
- [23] HAIRER, E. ; LUBICH, Christian ; ROCHE, Michel: *Lecture notes in mathematics*. Bd. 1409: *The numerical solution of differential-algebraic systems by*

- Runge-Kutta methods*. Berlin and New York : Springer-Verlag, 1989. – ISBN 9783540518600
- [24] YOUNIS, Mohammad I. ; ALSALEEM, Fadi: Exploration of New Concepts for Mass Detection in Electrostatically-Actuated Structures Based on Nonlinear Phenomena. In: *Journal of Computational and Nonlinear Dynamics* 4 (2009), Nr. 2, S. 021010. . – DOI 10.1115/1.3079785. – ISSN 15551423
- [25] PETHIG, Ronald R. (Hrsg.) ; SMITH, Stewart (Hrsg.): *Introduction to bioelectronics: For engineers and physical scientists*. Chichester : Wiley, 2012. – ISBN 978-1-119-97087-3
- [26] LAHANN, Joerg (Hrsg.): *Click Chemistry for Biotechnology and Materials Science*. Chichester, UK : John Wiley & Sons, Ltd, 2009. – ISBN 9780470748862
- [27] CHAPMAN-SMITH, Anne ; CRONAN JR, JOHN E.: Molecular Biology of Biotin Attachment to Proteins. In: *The Journal of Nutrition* 129 (1999), Nr. 2, S. 477S–484S
- [28] THE UNIPROT CONSORTIUM: Activities at the Universal Protein Resource (UniProt). In: *Nucleic Acids Research* 42 (2013), Nr. D1, S. D191–D198. – ISSN 0305–1048
- [29] SHU, Wenmiao ; LAUE, Ernest D. ; SESHIA, Ashwin A.: Investigation of biotin-streptavidin binding interactions using microcantilever sensors. In: *Biosensors & bioelectronics* 22 (2007), Nr. 9-10, S. 2003–2009. . – DOI 10.1016/j.bios.2006.08.047. – ISSN 0956–5663
- [30] SETO, Hirokazu ; YAMASHITA, Chie ; KAMBA, Seiji ; KONDO, Takashi ; HASEGAWA, Makoto ; MATSUNO, Mitsuhiro ; OGAWA, Yuichi ; HOSHINO, Yu ; MIURA, Yoshiko: Biotinylation of Silicon and Nickel Surfaces and Detection of Streptavidin as Biosensor. In: *Langmuir* 29 (2013), Nr. 30, S. 9457–9463. – ISSN 0743–7463
- [31] ZHANG, Jiayun ; LANG, Hans P. ; BATTISTON, Felice ; BACKMANN, Natalija ; HUBER, Francois ; GERBER, Christoph: Development of Robust and Standardized Cantilever Sensors Based on Biotin/Neutravidin Coupling for Antibody Detection. In: *Sensors* 13 (2013), Nr. 4, S. 5273–5285. – ISSN 1424–8220

- [32] CHAIET, Louis ; WOLF, Frank J.: The properties of streptavidin, a biotin-binding protein produced by Streptomyces. In: *Archives of Biochemistry and Biophysics* 106 (1964), S. 1–5. . – DOI 10.1016/0003-9861(64)90150-X. – ISSN 00039861
- [33] HUGHES, Walter L. ; DINTZIS, Howard M.: Crystallization of the Mercury Dimers of Human and Bovine Mercaptalbumin. In: *Journal of Biological Chemistry* 239 (1964), Nr. 3, S. 845–849
- [34] CHRISTMAN, Karen L. ; REQUA, Michael V. ; ENRIQUEZ-RIOS, Vanessa D. ; WARD, Sabrina C. ; BRADLEY, Kenneth A. ; TURNER, Kimberly L. ; MAYNARD, Heather D.: Submicron Streptavidin Patterns for Protein Assembly. In: *Langmuir* 22 (2006), Nr. 17, S. 7444–7450. – ISSN 0743-7463
- [35] PINAUD, Fabien ; MICHALET, Xavier ; BENTOLILA, Laurent A. ; TSAY, James M. ; DOOSE, Soren ; LI, Jack J. ; IYER, Gopal ; WEISS, Shimon: Advances in fluorescence imaging with quantum dot bio-probes. In: *Biomaterials* 27 (2006), Nr. 9, S. 1679–1687. – ISSN 0142-9612
- [36] RUDDOCK, L. W. ; WEBB, H. M. ; RUSTON, S. P. ; CHEESMAN, C. ; FREEDMAN, R. B. ; HIRST, T. R.: A pH-dependent conformational change in the B-subunit pentamer of Escherichia coli heat-labile enterotoxin: structural basis and possible functional role for a conserved feature of the AB5 toxin family. In: *Biochemistry* 35 (1996), Nr. 50, S. 16069–16076. – ISSN 0006-2960
- [37] MERRITT, Ethan A. ; SARFATY, Steve ; VAN DEN AKKER, Focco ; L’HOIR, Cécile ; MARTIAL, Joseph A. ; HOL, Wim G. J.: Crystal structure of cholera toxin B-pentamer bound to receptor GM1 pentasaccharide. In: *Protein science* 3 (1994), Nr. 2, S. 166–175. . – DOI 10.1002/pro.5560030202
- [38] VAN DEN BERG, L. H. ; MARRINK, J. ; DE JAGER, A. E. ; DE JONG, H. J. ; VAN IMHOFF, G. W. ; LATOV, N. ; SADIQ, S. A.: Anti-GM1 antibodies in patients with Guillain-Barré syndrome. In: *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 55 (1992), Nr. 1, S. 8–11
- [39] PADLAN, Eduardo A.: Anatomy of the antibody molecule. In: *Molecular Immunology* 31 (1994), Nr. 3, S. 169–217. . – DOI 10.1016/0161-5890(94)90001-9. – ISSN 01615890

- [40] MANOVA, Radostina K. ; PUJARI, Sidharam P. ; WEIJERS, Carel A. G. M. ; ZUILHOF, Han ; VAN BEEK, Teris A.: Copper-Free Click Biofunctionalization of Silicon Nitride Surfaces via Strain-Promoted Alkyne–Azide Cycloaddition Reactions. In: *Langmuir* 28 (2012), Nr. 23, S. 8651–8663. . – DOI 10.1021/la300921e. – ISSN 0743–7463
- [41] ROSSO, Michel ; GIESBERS, Marcel ; ARAFAT, Ahmed ; SCHROËN, Karin ; ZUILHOF, Han: Covalently Attached Organic Monolayers on SiC and SixN4 Surfaces: Formation Using UV Light at Room Temperature. In: *Langmuir* 25 (2009), Nr. 4, S. 2172–2180. . – DOI 10.1021/la803094y. – ISSN 0743–7463
- [42] ZHANG, Wenhua ; TURNER, Kimberly L.: Application of parametric resonance amplification in a single-crystal silicon micro-oscillator based mass sensor. In: *Sensors and Actuators A: Physical* 122 (2005), Nr. 1, S. 23–30. – ISSN 0924–4247
- [43] JOHNSTON, Matthew L. ; KYMISSIS, Ioannis ; SHEPARD, Kenneth L.: FBAR-CMOS Oscillator Array for Mass-Sensing Applications. In: *IEEE Sensors Journal* 10 (2010), Nr. 6, S. 1042–1047. – ISSN 1530–437X
- [44] YANG, Y. T. ; CALLEGARI, C. ; FENG, X. L. ; EKINCI, K. L. ; ROUKES, M. L.: Zeptogram-Scale Nanomechanical Mass Sensing. In: *Nano Letters* 6 (2006), Nr. 4, S. 583–586. . – DOI 10.1021/nl052134m
- [45] ORTIZ, Pedro ; BURNETT, Richie ; KEEGAN, Neil ; SPOORS, Julia ; HEDLEY, John ; HARRIS, Alun ; BURDESS, Jim ; RAPHOZ, Natacha ; COLLET, Joël ; MCNEIL, Calum: Issues associated with scaling up production of a lab demonstrated MEMS mass sensor. In: *Journal of Micromechanics and Microengineering* 22 (2012), Nr. 11, S. 115032. – ISSN 0960–1317
- [46] LI, Yingchun ; LUCKLUM, Ralf ; BROSE, Andreas ; FLEISCHER, Maximilian: A 2-step coating technique for CMUT based chemical sensors. In: *Sensors and Actuators B: Chemical* 161 (2012), Nr. 1, S. 171–177. – ISSN 0925–4005
- [47] ERARSLAN, Refik B. ; ADIYAN, Ulas ; LULEC, Sevil Z. ; OLCER, Selim ; TEMIZ, Yuksel ; LEBLEBICI, Yusuf ; TORUN, Hamdi ; UREY, Hakan: Design and characterization of micromachined sensor array integrated with CMOS based optical readout. In: *Sensors and Actuators A: Physical* 215 (2014), S. 44–50. . – DOI 10.1016/j.sna.2013.10.014. – ISSN 0924–4247

- [48] SHARMA, Harsh ; MUTHARASAN, Raj: Rapid and sensitive immunodetection of *Listeria monocytogenes* in milk using a novel piezoelectric cantilever sensor. In: *Biosensors and Bioelectronics* 45 (2013), Nr. 0, S. 158–162. – ISSN 0956–5663
- [49] ISMAIL, A. K. ; BURDESS, J. S. ; HARRIS, A. J. ; SUAREZ, G. ; KEEGAN, N. ; SPOORS, J. A. ; CHANG, S. C. ; MCNEIL, C. J. ; HEDLEY, J.: The fabrication, characterization and testing of a MEMS circular diaphragm mass sensor. In: *Journal of Micromechanics and Microengineering* 18 (2008), Nr. 2, S. 025021. . – DOI 10.1088/0960–1317/18/2/025021. – ISSN 0960–1317
- [50] LIN, Angel T.-H. ; YAN, Jize ; SESHIA, Ashwin A.: Electrically Addressed Dual Resonator Sensing Platform for Biochemical Detection. In: *Journal of Microelectromechanical Systems* 21 (2012), Nr. 1, S. 34–43. – ISSN 1057–7157
- [51] LEE, J. ; CHUNARA, R. ; SHEN, W. ; PAYER, K. ; BABCOCK, K. ; BURG, T. P. ; MANALIS, S. R.: Suspended microchannel resonators with piezoresistive sensors. In: *Lab Chip* 11 (2011), Nr. 4, S. 645–651. . – DOI 10.1039/C0LC00447B
- [52] LI, Xinxin ; YU, Haitao ; GAN, Xiaohua ; XIA, Xiaoyuan ; XU, Pengcheng ; LI, Jungang ; LIU, Min ; LI, Yongxiang: Integrated MEMS/NEMS Resonant Cantilevers for Ultrasensitive Biological Detection. In: *Journal of Sensors* 2009 (2009), S. 1–10. . – DOI 10.1155/2009/637874
- [53] TSAI, Hann-Huei ; LIN, Chen-Fu ; JUANG, Ying-Zong ; WANG, I-Long ; LIN, Yu-Cheng ; WANG, Ruey-Lue ; LIN, Hung-Yin: Multiple type biosensors fabricated using the CMOS BioMEMS platform. In: *Sensors and Actuators B: Chemical* 144 (2010), Nr. 2, S. 407–412. – ISSN 0925–4005
- [54] LANG, Hans P. ; HEGNER, Martin ; GERBER, Christoph: Cantilever array sensors. In: *Materials Today* 8 (2005), Nr. 4, S. 30–36. – ISSN 1369–7021
- [55] WINGQVIST, G. ; BJURSTRÖM, J. ; HELLGREN, A.-C. ; KATARDJIEV, I.: Immunosensor utilizing a shear mode thin film bulk acoustic sensor. In: *Sensors and Actuators B: Chemical* 127 (2007), Nr. 1, S. 248–252. – ISSN 0925–4005
- [56] ISMAIL, A. K. ; BURDESS, J. S. ; HARRIS, A. J. ; MCNEIL, C. J. ; HEDLEY, J. ; CHANG, S. C. ; SUAREZ, G.: The principle of a MEMS circular diaphragm mass sensor. In: *Journal of Micromechanics and Microengineering* 16 (2006), Nr. 8, S. 1487–1493. . – DOI 10.1088/0960–1317/16/8/008. – ISSN 0960–1317

- [57] ORTIZ, Pedro ; KEEGAN, Neil ; SPOORS, Julia ; HEDLEY, John ; HARRIS, Alun ; BURDESS, Jim ; BURNETT, Richard ; VELTEN, Thomas ; BIEHL, Margit ; KNOLL, Thorsten ; HABERER, Werner ; SOLOMON, Matthew ; CAMPITELLI, Andrew ; MCNEIL, Calum: A hybrid microfluidic system for cancer diagnosis based on MEMS biosensors. In: *IEEE Biomedical Circuits and Systems Conference, 2008*. Piscataway, NJ : IEEE, 2008. – ISBN 1424428785, S. 337–340
- [58] BURNETT, Richie ; HARRIS, Alun ; ORTIZ, Pedro ; HEDLEY, John ; BURDESS, James ; KEEGAN, Neil ; SPOORS, Julia ; MCNEIL, Calum: Electronic Detection Strategies for a MEMS-Based Biosensor. In: *Journal of Microelectromechanical Systems* 22 (2013), Nr. 2, S. 276–284. . – DOI 10.1109/JMEMS.2012.2219294. – ISSN 1057–7157
- [59] GRAHAM, Anthony H. D. ; ROBBINS, Jon ; BOWEN, Chris R. ; TAYLOR, John: Commercialisation of CMOS Integrated Circuit Technology in Multi-Electrode Arrays for Neuroscience and Cell-Based Biosensors. In: *Sensors* 11 (2011), Nr. 12, S. 4943–4971. – ISSN 1424–8220
- [60] RECEVEUR, Rogier A. M. ; LINDEMANS, Fred W. ; DE ROOIJ, Nicolaas F.: Microsystem technologies for implantable applications. In: *Journal of Micromechanics and Microengineering* 17 (2007), Nr. 5, S. R50–R80. . – DOI 10.1088/0960–1317/17/5/R02. – ISSN 0960–1317
- [61] MASON, W.P.: *Electromechanical Transducers and Wave Filters*. Van Nostrand, 1942
- [62] BURMESTER, Kim ; GOEHLICH, Andreas ; CELIK, Yusuf ; SCHMIDT, Andreas ; KLIEBER, Robert ; HAAS, Norbert ; GREIFENDORF, Dieter ; VOGT, Holger: CMOS integrated free standing circular membrane for the detection of allergens and biomarkers. In: VDI/VDE-IT (Hrsg.): *MikroSystemTechnik Kongress 2013*. Berlin : VDE-Verlag, 2013. – ISBN 3800735555
- [63] OSTEN, Wolfgang: *Optical Science and Engineering*. Bd. 109: *Optical inspection of microsystems*. Boca Raton, FL : CRC/Taylor & Francis, 2007. – ISBN 1420019163
- [64] HAEUSSLING, L. ; RINGSDORF, H. ; SCHMITT, F. J. ; KNOLL, W.: Biotin-functionalized self-assembled monolayers on gold: surface plasmon optical studies of specific recognition reactions. In: *Langmuir* 7 (1991), Nr. 9, S. 1837–1840. – ISSN 0743–7463



- [65] DEAN, John A. ; LANGE, Norbert A.: *Lange's handbook of chemistry*. 14th ed. New York : McGraw-Hill, 1992. – ISBN 9780070161948
- [66] FISCHER, W. ; GEIGER, H. ; RUDOLF, P. ; WISSMANN, P.: Structure investigations on single-crystal gold films. In: *Applied physics* 13 (1977), Nr. 3, S. 245–253. . – DOI 10.1007/BF00882888. – ISSN 0340–3793
- [67] KOLSKÁ, Zdenka ; ŘÍHA, J. ; HNATOWICZ, V. ; ŠVORČÍK, Vaclav: Lattice parameter and expected density of Au nano-structures sputtered on glass. In: *Materials Letters* 64 (2010), Nr. 10, S. 1160–1162. – ISSN 0167–577X
- [68] SIEGEL, Jakub ; LYUTAKOV, Olexiy ; RYBKA, Vladimir ; KOLSKA, Zdenka ; ŠVORČÍK, Vaclav: Properties of gold nanostructures sputtered on glass. In: *Nanoscale Research Letters* 6 (2011), Nr. 1, S. 96. – ISSN 1556–276X
- [69] PFOHL, Thomas ; MUGELE, Frieder ; SEEMANN, Ralf ; HERMINGHAUS, Stephan: Trends in Microfluidics with Complex Fluids. In: *ChemPhysChem* 4 (2003), Nr. 12, S. 1291–1298. – ISSN 14394235
- [70] ZIMMERMANN, Martin ; SCHMID, Heinz ; HUNZIKER, Patrick ; DELAMARCHE, Emmanuel: Capillary pumps for autonomous capillary systems. In: *Lab Chip* 7 (2007), Nr. 1, S. 119–125. . – DOI 10.1039/B609813D
- [71] TRILLING, Anke K. ; HESSELINK, Thamara ; VAN HOUWELINGEN, Adèle ; CORDEWENER, Jan H. G. ; JONGSMA, Maarten A. ; SCHOFFELEN, Sanne ; JAN C.M. VAN HEST ; ZUILHOF, Han ; BEEKWILDER, Jules: Orientation of llama antibodies strongly increases sensitivity of biosensors. In: *Biosensors and Bioelectronics* 60 (2014), Nr. 0, S. 130–136. – ISSN 0956–5663



# Danksagung

Für das Gelingen dieser Arbeit danke ich allen, die dazu beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Holger Vogt für die Schaffung hervorragender Rahmenbedingungen für Forschungsarbeiten und seine engagierte Betreuung bei der Anfertigung der vorliegenden Arbeit.

Ich danke Dr. Teris A. van Beek für die Bereitschaft zur Übernahme des Amtes als Gutachter und für sein Interesse und seine Unterstützung in der Arbeit. Das gemeinsame Experimentieren hat mir viel Freude bereitet.

Ich bedanke mich bei meinem Gruppenleiter, Dr. Andreas Goehlich, für seine Unterstützung und sein offenes Ohr.

Meinen Kollegen am Fraunhofer Institut für Mikroelektronische Schaltungen und Systeme (IMS) danke ich für die Hilfe in jeder Lage, für die fachlichen Diskussionen und für die angenehme Arbeitsatmosphäre. Bedanken möchte ich mich bei Dr. Dieter Greifendorf und Andreas Schmidt für ihre Unterstützung im Messaufbau, bei Norbert Haas für die integrierten Schaltungen, bei Johann Slotkowski für seine Unterstützung bei der Herstellung des Demonstrators, bei Dr. Sebastien Pierrat für die zahlreichen Diskussionen über biochemische Beschichtungen, bei Pierre Gembaczka für die Diskussionen über Drucksensoren, bei Dr. Robert Klieber für seine Geduld in der Beantwortung all meiner Fragen und die inhaltliche Vorbereitung des Projekts. Bei Ulrike Hutten, Andreas Schmidt, Katrin Neureiter und Nicole Bartek bedanke ich mich für die jahrelange Unterstützung in den Experimenten. Ich danke auch allen Korrekturlesern, besonders Dr. Wolfgang Heiermann, Dorothee Dietz und Dr. Jennifer Heß. Mein Dank geht auch an Charlotte, die mich während der Promotion unermüdlich auf Trab gehalten hat.

Den niederländischen Projektpartnern danke ich für ihre Unterstützung in der Chemie. Für die Funktionalisierung der Sensoroberflächen bedanke ich mich bei Dr. Radostina K. Manova der Universität Wageningen und bei Dr. Luc M.W. Scheres, Esther Roeven und Dr. Anke Trilling von Surfix B.V.

Für die zahlreichen Diskussionen über Allergene und das gemeinsame Experimentieren bedanke ich mich bei Dr. Angelique E. M. Wammes, für die Weiterentwicklung meiner Mikrofluidik bedanke ich mich bei Dr. Julian Thiele und für die Bereitstellung der Biotin funktionalisierten Nanopartikel bei Dr. Amarnath Chakraborty der Radboud Universität Nijmegen.

Nicht zuletzt gebührt mein Dankeschön meinen Eltern für ihre Unterstützung während meiner gesamten wissenschaftlichen Ausbildung.

Zum Schluss gilt mein besonderer Dank meinem Ehemann Hauke Burmester: Dankeschön, von ganzem Herzen, für Deine unendliche Bereitschaft, diesen Weg mit mir zu gehen.